

DANIELA FOJO SEIXAS CHAVES

**ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES E PROTEÍNAS
SECRETADAS POR *Herbaspirillum seropedicae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

CURITIBA

2008

ORIENTADORES:

Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa por ter me aceitado no grupo, pela orientação, pelos recursos disponibilizados e confiança;

À Prof. Rose Adele Monteiro pela co-orientação e ajuda;

Ao Prof. Emanuel Maltempi de Souza pelo interesse, discussões, sugestões e grande ajuda durante todo o período;

Ao Prof. Leonardo M. Cruz pelo auxílio com softwares e diversas ferramentas de bioinformática;

Ao Prof. Geoff Yates pelas correções de textos e sugestões;

Ao Humberto Ramos e Prof. Luciano Huergo pelas discussões de proteoma e cursos;

Ao Valter, D. Jú e Roseli Prado pela ajuda constante, interesse e apoio;

A todos os professores, ao curso de pós-graduação em bioquímica e todos os funcionários;

A todos os colegas do laboratório pelo bom convívio, amizade e prestatividade;

Ao IAPAR, LNCC, LNLS, IBMP, rede proteoma nacional e Bruker Daltonics pela oportunidade de participação em diversos cursos;

À CAPES pelo auxílio financeiro. Ao Genopar, Proteopar e Projeto Milênio pelos recursos disponibilizados;

Ao meu marido Leonardo pelo amor incondicional, companheirismo e apoio;

Aos meus pais Alaídes e Ricardo e meu irmão Igor pelo incentivo, torcida e carinho.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | PROTEOMA | 1 |
| 1.2 | SECREÇÃO DE PROTEÍNAS POR BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS..... | 6 |
| 1.2.1 | Sistema de Secreção Tipo I | 8 |
| 1.2.2 | Sistema de Secreção Tipo III | 9 |
| 1.2.3 | Sistema Sec-dependente..... | 17 |
| 1.2.4 | Sistema Tat-dependente | 21 |
| 1.2.5 | Sistema de Secreção Tipo II | 23 |
| 1.2.6 | Sistema de Secreção Tipo IV | 24 |
| 1.2.7 | Sistema de Secreção tipo V | 25 |
| 1.2.8 | Sistema de Secreção Não-Clássico | 27 |
| 1.3 | <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 28 |
| 1.4 | JUSTIFICATIVA | 30 |
| 2 | OBJETIVOS | 31 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 31 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| 3.1 | BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS | 33 |
| 3.2 | MEIOS DE CULTIVO PARA BACTÉRIAS | 34 |
| | Antibióticos | 35 |
| 3.3 | CONDIÇÕES DE CULTIVO..... | 36 |
| 3.4 | PREPARO DA AMOSTRA | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.4.1 | Proteínas secretadas..... | 37 |
| 3.4.2 | Proteínas de membrana | 37 |
| 3.4.3 | Proteínas celulares | 38 |
| 3.5 | DOSAGEM DE PROTEÍNAS..... | 38 |
| 3.6 | ELETROFORESE BIDIMENSIONAL | 39 |
| 3.6.1 | Isoeletrofocalização..... | 39 |
| 3.6.2 | Equilíbrio das tiras IPG..... | 39 |
| 3.6.3 | Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS- PAGE) | 40 |
| 3.6.4 | Visualização dos géis e captura das imagens..... | 40 |
| 3.6.5 | Análise computacional dos géis | 41 |
| 3.7 | ESPECTROMETRIA DE MASSAS | 42 |
| 3.7.1 | Preparo da Amostra..... | 42 |
| 3.7.2 | Obtenção e análise dos espectros de massa dos peptídeos trípticos | 43 |
| 3.7.3 | Identificação das Proteínas | 44 |
| 3.8 | FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA | 44 |
| 3.9 | MINI-PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS..... | 45 |
| 3.10 | ELETROFORESE DE DNA | 45 |
| 3.11 | DIGESTÃO DE DNA UTILIZANDO ENZIMAS DE RESTRIÇÃO | 46 |
| 3.12 | LIGAÇÃO DO DNA..... | 46 |
| 3.13 | PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES DE <i>H. seropedicae</i> | 46 |
| 3.14 | PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES DE <i>E. coli</i> | 46 |
| 3.15 | TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO..... | 47 |
| 3.16 | CONJUGAÇÃO BACTERIANA | 47 |
| 3.17 | CONSTRUÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 – 173 E <i>hrcN</i> -173 | 48 |
| 3.18 | CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pDS1 | 48 |
| 3.19 | CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS PLANTAS DE TOMATE..... | 48 |
| 3.20 | INOCULAÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE COM <i>H. seropedicae</i> | 50 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.20.1 | Preparo de extrato de lise de SmR1-173 | 50 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 52 |
| 4.1 | MAPA BIDIMENSIONAL REPRESENTATIVO DAS PROTEÍNAS CELULARES DE <i>H. seropedicae</i> | 52 |
| 4.1.1 | Mapa teórico das proteínas de <i>H. seropedicae</i> | 52 |
| 4.1.2 | Categorias funcionais das proteínas identificadas no gel de referência de <i>H. seropedicae</i> 54 | |
| 4.1.3 | Proteínas altamente expressas | 58 |
| 4.1.4 | Modificações pós-traducionais..... | 60 |
| 4.1.5 | Vias metabólicas potencialmente ativas | 66 |
| 4.2 | MAPA BIDIMENSIONAL REPRESENTATIVO DAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>H. seropedicae</i> | 68 |
| 4.2.1 | Análises <i>in silico</i> de prováveis mecanismos envolvidos na secreção de proteínas identificadas de <i>H. seropedicae</i> | 76 |
| 4.2.2 | Proteínas com peptídeo sinal Sec-dependente | 76 |
| 4.2.3 | Proteínas com peptídeo sinal Tat-dependente..... | 77 |
| 4.2.4 | Proteínas secretadas por mecanismos não clássicos | 77 |
| 4.3 | MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS | 81 |
| 4.3.1 | Transportadores ABC | 84 |
| 4.3.2 | Proteínas de flagelo | 85 |
| 4.4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS DO SECRETOMA DE REFERÊNCIA | 90 |
| 4.5 | ANÁLISE COMPARATIVA DE PROTEÍNAS SECRETADAS PELA ESTIRPE SELVAGEM SMR1 E MUTANTE RAMHN1..... | 91 |
| 4.5.1 | Análise de proteínas secretadas utilizando géis SDS-PAGE..... | 91 |
| 4.5.2 | Análise de proteínas secretadas pelas estirpes SmR1 e mutante (RAMHN1) de <i>H. seropedicae</i> utilizando eletroforese bidimensional..... | 92 |
| 4.6 | INDUÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III POR HrpL | 97 |
| 4.6.1 | Análise comparativa de proteínas secretadas pelas estirpes SmR1 e SmR1-pDS1 de <i>H. seropedicae</i> | 97 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.6.2 | Análise comparativa de proteínas na fração de membrana das estirpes SmR1, mutante RAMHN1 e mutante SmR1-pDS1 de <i>H. seropedicae</i> | 99 |
| 4.7 | ANÁLISE <i>IN VIVO</i> DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III DE <i>H. seropedicae</i> | 100 |
| | <i>seropedicae</i> foram utilizados para inocular plantas de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> , cultivar Santa Cruz Kada Gigante). | 102 |
| 4.7.1 | Experimento 1 | 102 |
| 4.7.2 | Experimento 2A..... | 102 |
| 4.7.3 | Experimento 2B..... | 103 |
| 4.8 | ANÁLISE COMPARATIVA DAS ESTIRPES SmR1-173 e <i>hrcN</i> -173 | 109 |
| 4.8.1 | Proteínas diferencialmente secretadas nas estirpes SmR1-173 e <i>hrcN</i> -173..... | 109 |
| 4.8.2 | Proteínas induzidas no secretoma da estirpe SmR1 de <i>H. seropedicae</i> contendo a proteína AvrPtoB | 114 |
| 4.8.3 | Proteínas secretadas pela estirpe mutante <i>hrcN</i> -173 de <i>H. seropedicae</i> contendo o plasmídeo codificando a proteína AvrPtoB..... | 115 |
| 4.8.4 | Considerações Finais | 123 |
| 5 | CONCLUSÕES | 124 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 126 |
| 7 | ANEXOS..... | 143 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – MECANISMOS DE SECREÇÃO EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS | 10 |
| FIGURA 2 – ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM <i>P. syringae</i> | 14 |
| FIGURA 3 - MAPA TEÓRICO DO PROTEOMA COMPLETO DE <i>H. seropedicae</i> ... | 53 |
| FIGURA 4 - MAPA DE REFERÊNCIA DO PROTEOMA DAS PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE <i>H. seropedicae</i> | 55 |
| FIGURA 5 - CLASSES DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO GEL DE REFERÊNCIA DE <i>H. seropedicae</i> | 57 |
| FIGURA 6 - CATEGORIA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E PROTEÍNAS ANOTADAS NO GENOMA DE <i>H. seropedicae</i> | 59 |
| FIGURA 7 - MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) DE <i>H. seropedicae</i> | 67 |
| FIGURA 8 – GEL DE REFERÊNCIA DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>H.</i> <i>seropedicae</i> | 70 |
| FIGURA 9 – ANÁLISE COMPARATIVA DE PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES IDENTIFICADAS NO PROTEOMA CELULAR E SECRETOMA | 75 |
| FIGURA 10: LOCALIZAÇÃO CELULAR PREVISTA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO SECRETOMA DE <i>H. seropedicae</i> | 93 |
| FIGURA 11 - GEL COMPARATIVO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS SECRETADAS PELAS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTE RAMHN1 | 98 |

| | |
|--|------------|
| FIGURA 12 - GEL COMPARATIVO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS SECRETADAS E PROTEÍNAS DE MEMBRANA DAS ESTIRPES SMR1 E SMR1-DS1 | 101 |
| FIGURA 13 - FOTOS DAS FOLHAS DE TOMATE INOCULADAS COM AS ESTIRPES Smr1, RAMHN1, Smr1-173 E <i>hrcN</i>-173 DE <i>H. seropedicae</i> - EXPERIMENTOS 1 E 2A | 105 |
| FIGURA 14 - FOTOS DAS FOLHAS DE TOMATE INOCULADAS COM AS ESTIRPES Smr1, RAMHN1, Smr1-173 E <i>hrcN</i>-173 DE <i>H. seropedicae</i> - EXPERIMENTO 2B..... | 106 |
| FIGURA 15 - ANÁLISE COMPARATIVA DE ELETROFORESE 2D DA ESTIRPE SELVAGEM SMR1 COM E SEM A PROTEÍNA AvrPtoB DE <i>P. syringae</i> | 111 |
| FIGURA 16 – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE ISOFORMAS DA FLIC NAS ESTIRPES SMR1-173 E <i>hrcN</i>-173 | 121 |
| FIGURA 17 - COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO N-TERMINAL CONSERVADA DA FLAGELINA COM A SEQUÊNCIA N-TERMINAL DA FLAGELINA DE <i>H. seropedicae</i> | 122 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS | 27 |
| TABELA 2 - PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES NO PROTEOMA DE REFERÊNCIA DE <i>H. seropedicae</i> | 56 |
| TABELA 3 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM DIVERSOS LOCAIS DO GEL-2D DE REFERÊNCIA DE <i>H. seropedicae</i> | 59 |
| TABELA 4 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO GEL DE REFERÊNCIA DE PROTEÍNAS SECRETADAS PELA ESTIRPE SMR1 DE <i>H. seropedicae</i> | 66 |
| TABELA 5 – PROTEÍNAS COM PEPTÍDEO SINAL SEC-DEPENDENTE | 73 |
| TABELA 6 – PROTEÍNAS COM PEPTÍDEO SINAL TAT-DEPENDENTE | 74 |
| TABELA 7 – PROTEÍNAS SECRETADAS POR MECANISMOS NÃO CLÁSSICOS | 77 |
| TABELA 8 – PROTEÍNAS COM POSSÍVEIS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS | 81 |
| TABELA 9 - PROTEÍNAS SECRETADAS PELAS ESTIRPES SELVAGEM (SMR1) E MUTANTE (RAMHN1) CONTENDO O PLASMÍDEO CODIFICANDO PARA A PROTEÍNA AvrPtoB | 108 |
| TABELA 10 - PROTEÍNAS SECRETADAS PELA ESTIRPE SMR1 DE <i>H. seropedicae</i> COM O PLASMÍDEO CODIFICANDO A PROTEÍNA AvrPtoB | 112 |
| TABELA 11 - PROTEÍNAS SECRETADAS PELA ESTIRPE MUTANTE (RAMHN1) CONTENDO O PLASMÍDEO CODIFICANDO A PROTEÍNA AvrPtoB | 114 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| μF | micro faraday |
| μm | micrometro |
| p/v | peso/volume |
| h | hora |
| x g | gravidade |
| ABC | ATP binding cassette |
| ACN | acetonitrila |
| Amp | ampicilina |
| ATP | adenosina trifosfato |
| ATPase | enzima que catalisa a hidrólise do ATP |
| BSA | albumina de soro bovino |
| CHAPS | ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato |
| CID | dissociação por colisão induzida |
| Cm | cloranfenicol |
| D.O. | densidade óptica |
| Da | dalton |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DTT | ditiotreitól |
| EDTA | ácido etilenodiamino-tetra-acético |
| 2D | bidimensional |
| ESI | ionização por eletrospray |
| EST | etiqueta de sequência expressa |
| g | grama |
| GTP | guanosina trifosfato |
| GTPase | enzimas que hidrolisam GTP |

| | |
|------------|---|
| HCCA | ácido α -ciano-4-hidroxiamínico |
| HR | reação de hipersensibilidade |
| hrc | hrp conservado |
| hrp | resposta hipersensitiva e patogenicidade |
| IEF | focalização isoelétrica |
| IPG | gradiente de pH imobilizado |
| K Ω | quiloohms |
| kDa | quilodalton |
| KEGG | enciclopédia Kyoto de genes e genomas |
| Km | canamicina |
| kV | quilovolts |
| L | litro |
| m/z | razão massa/carga |
| mA | miliamper |
| MALDI | ionização dessorção a laser assistida por matriz |
| mg | miligrama |
| MI | membrana interna |
| Min | minuto |
| mL | mililitro |
| MS | espectrometria de massas |
| MM | massa molecular |
| NADPH | nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido |
| LC | cromatografia líquida |
| ng | nanograma |
| nm | nanômetro |
| ns | nano segundos |
| ORF | região codificadora de proteína |
| pb | pares de base |

| | |
|----------|---|
| PF | proteína de fusão |
| pI | ponto isoelétrico |
| PME | proteína de membrana externa |
| PMF | impressão digital de peptídeos |
| PMSF | fluoreto de fenil-metil-sulfonilo |
| RNA | ácido ribonucléico |
| rpm | rotações por minuto |
| SDS | docecilsulfato de sódio |
| SDS-PAGE | eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio |
| Sm | estreptomicina |
| SNAP | procedimento sofisticado de anotação numérica |
| Spases | peptidases de sinal |
| SRP | partícula de reconhecimento de sinal |
| SSTT | sistema de secreção tipo III |
| TAT | translocação de argininas consecutivas |
| Tc | tetraciclina |
| TCA | ácido tricloroacético |
| TFA | ácido trifluoracético |
| ToF | tempo de voo |
| Vhr | voltagem/hora |
| VhT | voltagem/hora total |

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma beta-proteobactéria endofítica fixadora de nitrogênio. O presente trabalho teve como objetivo determinar o proteoma celular e das proteínas secretadas por *H. seropedicae*, assim como verificar a funcionalidade do sistema de secreção tipo III (SSTT). Primeiramente foi determinado o mapa bidimensional (2D) de referência de proteínas celulares. Deste mapa, foram identificadas 207 bandas protéicas representando 177 proteínas diferentes. Em seguida, foi construído o mapa de referência das proteínas secretadas, onde foram identificadas 65 bandas protéicas representando 41 proteínas únicas. Análises comparativas foram feitas entre a estirpe SmR1 e uma estirpe mutante *hrcN* utilizando eletroforese bidimensional. A única diferença detectada foi a presença de isoformas adicionais da proteína FlhD na estirpe mutante *hrcN*. Para analisar a função do SSTT “*in vivo*”, foi introduzido um plasmídeo codificando para a proteína AvrPtoB. Estirpes com e sem plasmídeo foram usadas para inocular folhas de tomateiro. As estirpes sem plasmídeo não causaram sintomas, ou apenas um pequeno ponto necrótico na área de inóculo. Por outro lado, as duas estirpes com plasmídeo causaram sintomas do tipo lesão molhada, clorose e necrose. Por último, uma análise comparativa entre os secretomas das estirpes com e sem plasmídeo revelou a presença de proteínas adicionais nas estirpes com plasmídeos, o que pode ajudar a explicar em parte, os sintomas observados em folhas de tomateiro.

Palavras-chave: *H. seropedicae*; proteoma, proteínas secretadas, eletroforese bidimensional, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic, nitrogen-fixing proteobacterium. The present work aims at determining the cellular and secreted proteomes of *H. seropedicae* and also to check the function of the type III secretion system (TTSS). Firstly, the cellular 2D reference map was determined. From this map, 207 spots were identified, representing 177 different proteins. Secondly, the secretome reference map was determined, where 65 spots representing 41 different proteins were identified. Comparative analysis of the SmR1 strain and a mutant strain (*hrcN*) was performed using 2D electrophoresis. The only difference detected was the presence of different FlhD isoforms in the mutant strain. To study the functioning of the TTSS in vivo, a plasmid coding for the AvrPtoB protein was introduced in *H. seropedicae*. Strains carrying this plasmid and also control strains were inoculated in tomato plants. Control strains failed to cause any symptoms or caused only a small necrotic spot around the inoculation point. On the other hand, both the wild type and mutant strains with the plasmid caused water-soaked lesions, chlorosis and necrosis. Finally, a comparative analysis of the secretomes of strains with and without the plasmid showed additional proteins in the strains with the plasmid, which may be responsible for some of the observed symptoms in tomato plants.

Key words: *H. seropedicae*; proteome, secreted proteins, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROTEOMA

O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez em 1995 para descrever o complemento protéico total do genoma. A principal meta de estudos proteômicos consiste em obter uma visão biológica global e integrada estudando simultaneamente todas as proteínas presentes em uma determinada célula, em vez de estudar cada proteína individualmente (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Contrariamente ao genoma, que funciona como um repositório essencialmente estático da informação genética, o proteoma é altamente dinâmico, refletindo o ambiente no qual uma determinada célula ou organismo se encontra. Em resposta a estímulos ou diferentes condições de cultivo, a expressão protéica pode ser alterada, as proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais ou ainda modificação na sua localização celular. Desta forma, o proteoma fornece informações das proteínas presentes em uma célula em um determinado momento e um mesmo genoma pode potencialmente originar um número infinito de proteomas (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Após a seqüência completa do genoma de um organismo ter sido determinada, quadros de leitura aberta ou ORFs (*Open Reading Frames*), nas seqüências de nucleotídeos podem ser preditas, identificando todas as prováveis proteínas codificadas. Entre estas ORF's, muitas codificam para proteínas hipotéticas, cuja comprovação da existência está baseada unicamente em análises computacionais das seqüências genômicas e suas funções são desconhecidas

(CASH 2002). Aproximadamente 30% das ORF's de organismos já seqüenciados codificam para proteínas hipotéticas, cuja comprovação de existência requer seu aparecimento físico. A confirmação de um produto gênico através da análise proteômica é um passo importante complementar à anotação do genoma (PANDEY & MANN, 2000). Em um estudo proteômico realizado por CASH e colaboradores (1998) com *Hemophilus influenzae* foram observadas, entre as proteínas mais abundantes, os produtos de 19 ORFs hipotéticas demonstrando, portanto, a importância desta análise para o conhecimento detalhado do genoma e a funcionalidade dos genes anotados.

As proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação, metilação, acetilação e clivagem proteolítica entre outras. Por este motivo, a estrutura final e função das diversas proteínas não podem ser definidas com base apenas nas seqüências nucleotídicas dos genes que as codificam (CAHIL et al., 2001). Em bactérias, um único gene pode codificar para uma ou mais proteínas em um gel bidimensional devido às modificações pós-traducionais e pós-transcricionais (WILKINKS et al., 1996). Até mesmo para organismos pouco complexos, como o *Mycoplasma genitalium*, existem 24% mais proteínas do que genes (ABBOT, 1999).

O grande número de informações obtidas pelo seqüenciamento do genoma sugere possíveis modos de expressão dos genes, mas não provê dados sobre eventuais modificações pós traducionais nem do controle da atividade em resposta a condições particulares. Estes problemas podem ser resolvidos estudando a expressão gênica através dos níveis de RNAm ou dos níveis protéicos (DUNN, 2003). Análise do RNAm fornece informações a respeito da função gênica, porém este é um modo indireto, tendo em vista que os RNAm são os intermediários na

expressão da informação genética e não as entidades funcionais em si. Além disso, diversos estudos demonstraram que há baixa correlação entre a abundância de RNAm na célula e proteínas (OLIVER, 2000). Adicionalmente, estudos de RNAm não fornecem informações a respeito de modificações pós-traducionais (MANN & JENSEN, 2003).

A Proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK & WEIR, 1999). Uma descrição completa do proteoma de um organismo fornece, não apenas um catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições definidas e a distribuição dessas proteínas na célula (CASH, 1998). Portanto, o passo do genoma para o proteoma é um passo do nível da informação genética para a função celular. As concentrações de proteínas que são alteradas em determinadas condições fisiológicas mostram quais funções sofrem modificações (JUNGBLUT, 2001).

Os primeiros estudos proteômicos foram feitos utilizando eletroforese bidimensional (2D). Esta técnica foi pioneiramente e independentemente descrita por O'FARREL (1975) e KLOSE (1975). A metodologia 2D consiste em duas corridas eletroforéticas seqüenciais: focalização isoeletrica (IEF) e eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Na primeira dimensão, denominada focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico. Após esta primeira etapa, é feita eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, no qual as proteínas da fita

distribuídas de acordo com seu pI são separadas conforme suas massas moleculares.

A eletroforese bidimensional é um método de separação eficiente porque permite separar simultaneamente centenas de proteínas diferentes, possibilitando a análise de amostras complexas, como extratos celulares. Ao final do processo, é obtido um mapa bidimensional (mapa-2D) da amostra, onde as proteínas são separadas com base no seu ponto isoelétrico (pI) na horizontal, e massa molecular aparente na vertical (WESTERMEIER, 2004). Tal procedimento fornece informações úteis como ponto isoelétrico, peso molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais (PANDEY & MANN, 2000, CASH, 1998; JUNGBLUT, 2001; HERBERT et al., 2001).

Esta metodologia vem sendo amplamente utilizada para estudar o secretoma de inúmeros patógenos de animais e plantas. Normalmente, o primeiro passo consiste em obter géis bidimensionais com o maior número possível de proteínas identificadas. A partir destes géis de referência, podem-se realizar análises comparativas com o objetivo de estudar a resposta celular a diferentes estímulos. Estes estudos fornecem dados importantes a respeito da expressão diferencial de proteínas e suas modificações pós-traducionais (WEHMHONER et al., 2003; KAZEMI-POUR et al., 2004; WALZ et al., 2007; CHITLARU et al., 2006)

Após separação das proteínas, estas necessitam ser identificadas. Um modo de identificar as proteínas é através da espectrometria de massas. Os espectrômetros de massa são instrumentos analíticos que determinam a massa molecular de compostos químicos através da ionização e posterior separação dos

íons moleculares de acordo com sua razão massa/carga (m/z) . Basicamente, os espectrômetros são constituídos por uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector.

O espectrômetro MALDI-ToF utiliza MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) como fonte de íons e está acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo, ToF (*Time of Flight*). As abordagens mais utilizadas para caracterização e identificação de proteínas por espectrometria de massa são a impressão digital de peptídeos (PMF – *Peptide Mass Fingerprint*) e o seqüenciamento peptídico.

Na identificação por impressão digital de peptídeos, as proteínas de interesse são submetidas à digestão enzimática utilizando uma protease que faz clivagem específica. Os peptídeos resultantes são extraídos do gel e submetidos à análise em espectrômetros de massa. A enzima mais utilizada neste tipo de análise é a tripsina, que faz clivagem específica C-terminal adjacente a resíduos de lisina e arginina se estes não forem precedidos por prolina (SHEVCHENKO et al., 1996; CAGNEY et al., 2003).

Um pré-requisito para identificação eficiente de proteínas utilizando PMF é possuir o genoma do organismo que está sendo estudado. Para tal procedimento, todas as proteínas do genoma são digeridas “*in silico*”, utilizando a mesma enzima experimental. Posteriormente, através da utilização de algoritmos sofisticados [“Bayesian” em ProFound, “MOWSE modificado” e “Número de matches” em MSFit e “MOWSE baseado em probabilidade” no Mascot] é feita uma comparação entre as

massas obtidas experimentalmente e aquelas obtidas teoricamente (BEAVIS & FENYO, 2000; TANG et al., 2000).

Tal metodologia não é eficiente para identificação de proteínas provenientes de organismos cujos genomas não foram completamente seqüenciados, tendo em vista que a substituição de apenas um aminoácido leva a uma modificação significativa na massa do peptídeo, impossibilitando sua correta identificação. Quando não há disponibilidade do genoma, ou existem apenas dados provenientes de ESTs, a alternativa mais eficiente para identificação das proteínas é a fragmentação de um ou mais peptídeos provenientes da digestão trípica (AEBERSOLD & GOODLET, 2001).

Os dados provenientes da fragmentação podem ser utilizados para fazer busca em sequências disponíveis em banco de dados utilizando o modo ms/ms de alguns dos programas utilizados para identificar proteínas por PMF (ProFound, MSFit, Mascot). Quando a sequência sendo procurada não está disponível no banco de dados, alternativamente, pode-se realizar sequenciamento de novo, com auxílio de programas de computador como PepSeq e Mascot. Deste modo, a partir do espectro MS/MS é possível determinar a estrutura primária do peptídeo selecionado.

1.2 SECREÇÃO DE PROTEÍNAS POR BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

A secreção de proteínas é indispensável no ciclo de vida de microrganismos, estando envolvida na biogênese de organelas, aquisição de nutrientes, liberação de

fatores de virulência e interação planta-bactéria. O termo “secreção de proteínas” descreve o transporte ativo destas do citoplasma da célula através das membranas interna e externa até o sobrenadante bacteriano ou superfície da célula. Já o termo “exportação” refere-se ao transporte de proteínas do citoplasma ao espaço periplasmático (HUECK, 1998; PUGSLEY, 1993).

O envelope celular de bactérias gram-negativas contém duas membranas: a membrana interna citoplasmática e a membrana externa. A membrana externa e a camada de peptidoglicanos adjacente a ela constituem a parede celular. O espaço entre a parede celular e a membrana citoplasmática é denominado periplasma (DECAD & NIKAIIDO, 1976). Portanto, para serem secretadas, as proteínas necessitam atravessar a membrana interna, o periplasma e a parede celular (THANASSI & HULTGREN, 2000; PUGSLEY, 1993)

Apesar do grande número, diversidade e funções das proteínas secretadas, estas são translocadas utilizando um número limitado de mecanismos. Os sistemas de transporte podem ser classificados em Sec-dependentes e Sec-independentes. Os sistemas Sec-independentes tipo I, III e IV transportam proteínas através das duas membranas em um único passo sem intermediários periplasmáticos. Os sistemas Sec-dependente e Tat-dependente transportam proteínas através da membrana citoplasmática. Uma vez no periplasma, as proteínas podem atravessar a membrana externa pelo sistema tipo II, autotransporte, proteína acessória ou chaperona “Usher” (PRESTON et al., 2005; GONZÁLEZ-PEDRAJO & DREYFUS, 2003). Os diferentes mecanismos de secreção em bactérias gram-negativas estão esquematizados na figura 1.

1.2.1 Sistema de Secreção Tipo I

O sistema de secreção tipo I está normalmente relacionado à secreção de diferentes toxinas, proteases e lipases por uma grande variedade de patógenos de animais e plantas. Entretanto, este sistema é essencialmente promíscuo e seus substratos variam desde proteínas relativamente pequenas (19 kDa) até complexos protéicos com massa molecular de aproximadamente 800 kDa (HOLLAND et al., 2005).

O aparato de translocação é constituído por três componentes: um canal da membrana externa denominado proteína de membrana externa (PME), um transportador tipo ABC na membrana interna (MI) e uma proteína periplasmática que forma uma ponte entre as duas, denominada proteína de fusão (PF) (THANASSI & HULTGREN, 2000).

O sinal para secreção está geralmente localizado nos últimos 60 aminoácidos da região C-terminal e não é removido durante o transporte (LÉTOFFÉ et al., 1997). Apesar do sinal não ser altamente conservado, eles têm em comum uma região rica em glicina –GGXGXD- repetida de 4 a 36 vezes (BINGLE et al., 2000). Este sinal é reconhecido especificamente pela proteína ABC, iniciando a montagem do aparato de translocação (DEPELAIRE, 2004).

O protótipo de estudo desta via é a secreção da α -hemolisina (HlyA) pela *Escherichia coli* (WELCH et al., 1981). Neste modelo, HlyB é o transportador ABC, que forma um homodímero e possui domínios citoplasmático e é uma proteína integral de membrana. HlyD fica ancorada ao citoplasma e ocupa também o espaço

periplasmático . A proteína TolC possui um extenso domínio periplasmático e forma um trímero na membrana externa (HOLLAND et al., 2005).

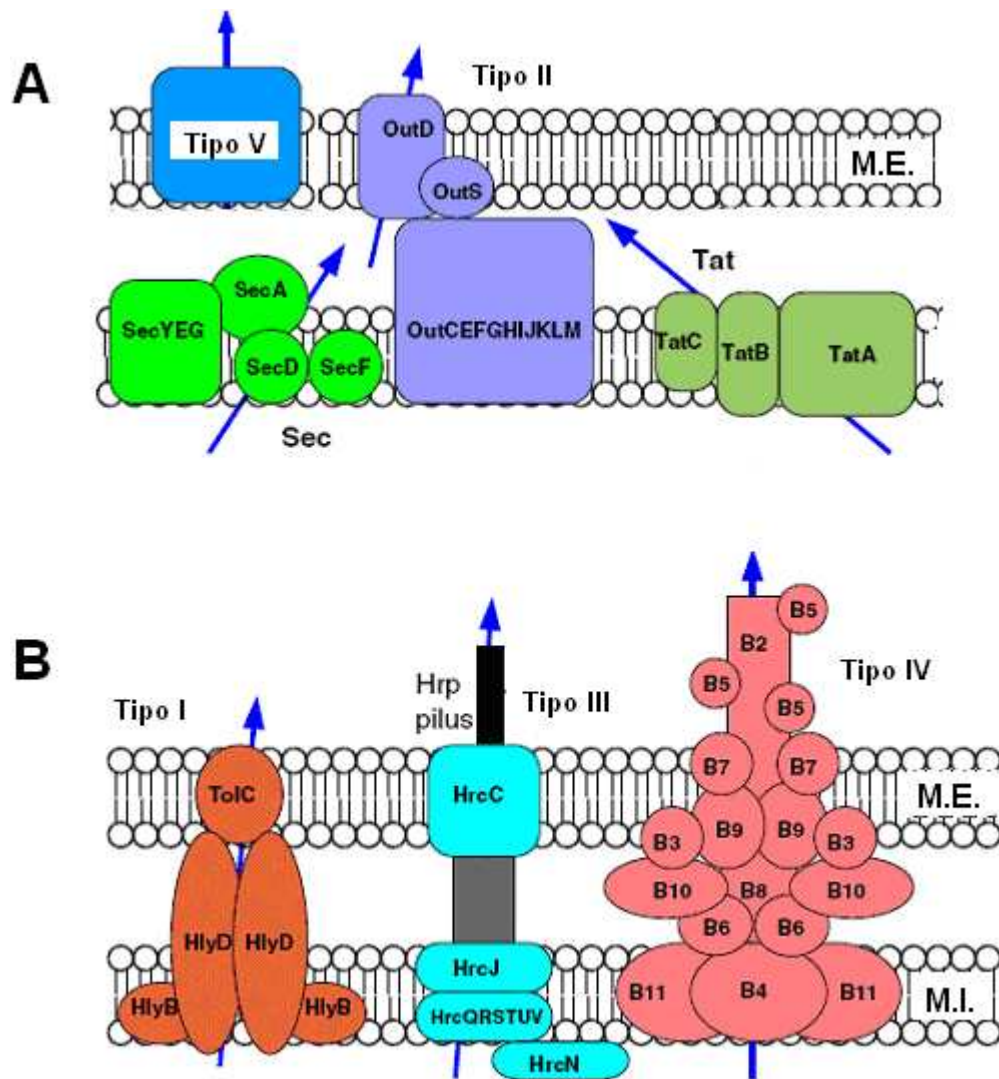
O modelo de translocação desta proteína postula que em uma primeira etapa, ocorre interação entre as proteínas HlyB e HlyD. Posteriormente o substrato se une ao complexo através do reconhecimento específico do sinal carboxi-terminal pela proteína HlyB. Quando ocorre formação do complexo HlyA-HlyB-HlyD, forma-se uma conexão com o poro de saída, TolC na membrana externa, formando um canal que atravessa o periplasma. O canal formado é transistório e se colapsa após a secreção (GENTSCHEV et al., 2002). A energia para o transporte é fornecida pela atividade ATPásica da proteína HlyB que tem papel importante no reconhecimento de HlyA e no início do transporte. O transporte ocorre em apenas uma etapa sem intermediários periplasmáticos (HOLLAND et al., 2005).

1.2.2 Sistema de Secreção Tipo III

O sistema de secreção tipo III (SSTT) é capaz de translocar proteínas da célula bacteriana diretamente até o citoplasma da célula hospedeira através de um complexo aparato de secreção que atravessa a membrana interna e externa da célula bacteriana (HUECK, 1998).

O sistema tipo III foi pioneiramente descrito no gênero *Yersinia*. Na década de 90, Michiels e colaboradores (1990) demonstraram que proteínas denominadas Yops (*Yersinia* outer membrane proteins) não eram proteínas de membrana externa, mas sim proteínas secretadas no meio de cultura.

FIGURA 1 – MECANISMOS DE SECREÇÃO EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS



A) Mecanismos de secreção Sec-dependentes B) Mecanismos Sec-independentes. M.E. = Membrana externa; M.I. = Membrana interna. Modificado de PRESTON e colaboradores (2005).

Os mesmos pesquisadores mostraram que estas proteínas não possuíam peptídeo sinal clivável. Posteriormente, quando o sistema de secreção destas proteínas foi estabelecido, os genes estruturais deste sistema foram denominados *ysc* (*Yop secretion*). Em *Y. enterocolitica* foram denominados *vir* (*virulence*) e *lcrD* (*low calcium response*) em *Y. pestis* (CORNELIS et al., 1998). Posteriormente, genes *hrp* de outros patógenos foram caracterizados e receberam diferentes nomes. Em 1996, Bogdanove e colaboradores propuseram uma nomenclatura unificada para estes genes. Nove genes que codificam para componentes do sistema estrutural são amplamente conservados em fitopatógenos e patógenos de animais e foram denominados *hrc* (*hrp conserved*). A última letra do gene corresponde à última letra do gene homólogo em *Yersinia* (BOGDANOVE et al., 1996).

O sistema é composto por aproximadamente 20 proteínas, a maioria localizada na membrana interna (LEE & SCHNEEWIND, 2001; HUECK et al., 1998; MARIE et al., 2003). Cerca de metade destas proteínas são amplamente conservadas em todos os SSTT. Entre estas, encontram-se uma proteína de membrana externa (HrcC), uma lipoproteína associada a membrana interna (HrcJ), cinco proteínas de membrana interna (HrcV, HrcR, HrcS, HrcX, HrcU) e duas proteínas citoplasmáticas (HrpE, HrcN). Uma das proteínas citoplasmáticas (HrcN) é responsável por fornecer energia à maquinaria de secreção. Esta proteína possui homologia com o domínio de ligação a ATP da subunidade β do componente F1 da ATP sintase e mutações em seu domínio catalítico levam à perda da capacidade de secreção (GAUTHIER et al., 2003).

A estrutura do complexo pode ser dividida em duas partes: i) a porção extracelular, que faz a conexão entre a célula procariótica e a célula hospedeira é

denominado de “agulha” em patógenos animais (COOMBES & FINLAY, 2005) e “pilus Hrp” em fitopatógenos; ii) uma base cilíndrica, similar ao corpo basal do flagelo, que estabiliza toda a estrutura celular no envelope celular (TAMPAKAKI et al., 2004). Tanto em fitopatógenos quanto em patógenos animais, mutações que resultam em um sistema não funcional transformam o patógeno em avirulento ou diminuem sua virulência em muitas ordens de magnitude (COOMBES & FINLAY, 2005).

Sistemas de secreção tipo III já foram identificados em mais de 20 patógenos de animais e plantas. Apesar do alto grau de conservação entre os componentes do sistema de diferentes espécies, cada patógeno possui um repertório de fatores de virulência característico secretado, com uma variedade de funções na célula animal ou vegetal (GAUTHIER et al., 2003; CORNELIS et al., 1998). Proteínas secretadas por este sistema são proteínas bacterianas ditas efetadoras, capazes de alterar a biologia celular da célula hospedeira propiciando a sobrevivência e multiplicação da bactéria neste ambiente.

Os quatro grupamentos de genes *hrp* de fitopatógenos que têm sido melhor caracterizados podem ser divididos em dois grupos conforme a similaridade entre os genes, a estrutura dos operons e sistema regulatório. O sistema de *Pseudomonas syringae* e *Erwinia amylovora* é classificado como grupo I e os de *R. solanacearum* e *X. campestris* como grupo II (ALFANO & COLLMER, 1997).

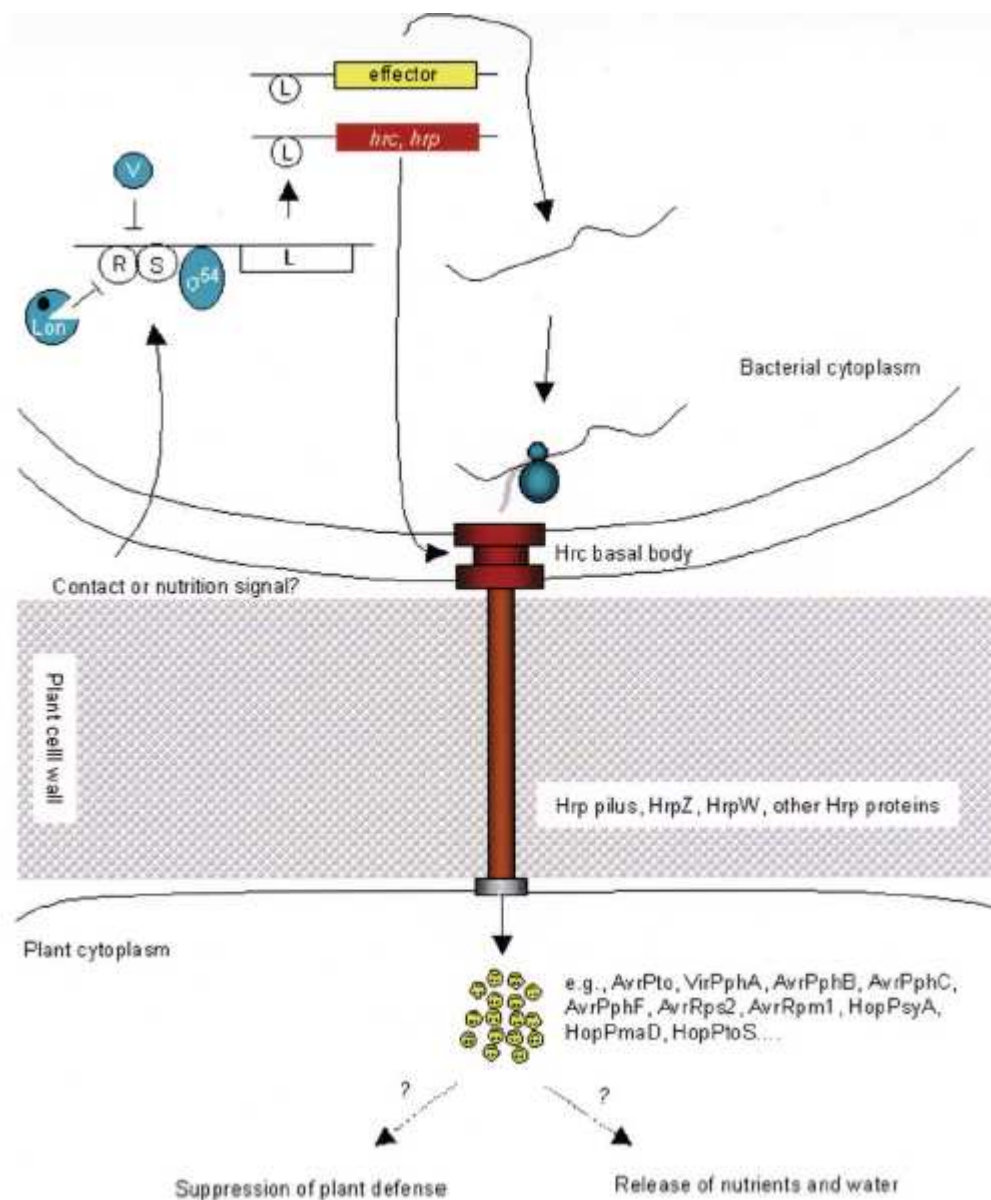
No grupo I a ativação transcricional dos genes *hrp* é feita por HrpL, um fator sigma alternativo, e a expressão deste é ativada pela proteína HrpS que é ativada por HrpR (figura 2). A expressão de *hrpL* é feita a partir de um promotor dependente

de RpoN. HrpL liga-se a sequências promotoras que foram denominadas *hrp box* (XIAO et al., 1994; HUECK, 1998).

Os operons do grupo II são ativados em resposta a estímulos ambientais por ativadores de transcrição do tipo AraC. Em *X. campestris* este é denominado HrpX e em *R. solanacearum* HrpB (ALFANO & COLLMER, 1997). Nos dois patógenos, os genes que codificam para os reguladores tipo AraC estão sujeitos a ativação transcricional por crescimento em meio mínimo. Foi observada autoregulação parcial em *P. solanacearum*, entretanto, a transcrição de *hrpX* em *X. campestris* não requer seu próprio produto. Em *X. campestris* a expressão dos genes do sistema tipo III é ativada por HrpG (WENGELNIK et al., 1996; LINDGREN, 1997).

As proteínas secretadas pela via tipo III não estão sujeitas a processamento amino-terminal durante sua secreção. Em *Yersinia sp.*, o sinal para secreção está localizado na região N-terminal da proteína, sendo que o número mínimo de resíduos necessários para que ocorra secreção varia entre 11 e 48 (CORNELIS et al., 1998). Entretanto, estas sequências N-terminais não possuem similaridade de sequência primária ou características em comum como hidrofobicidade ou estrutura primária (MICHIELS et al., 1990). Análises mutacionais exaustivas revelaram que algumas destas proteínas possuem alta tolerância para mudanças na sequência desta região sem que ocorra perda da secreção (HUECK et al., 1998; CORNELIS et al., 1998). Alternativamente, foi proposto que o sinal para secreção resida na região 5' do RNAm que codifica para as proteínas secretadas (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1997).

FIGURA 2 – ATIVAÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM *P. syringae*



Ativação do SSTT em *P. syringae*. Um sinal desconhecido no apoplasto da planta ativa a cascata de transdução de sinal *hrpR/hrpS/hrpL*, que leva à transcrição dos genes *hrc / hrp*. As proteínas ativadoras de transcrição HrpR (R) e HrpS (S) interagem e ativam o promotor de *hrpL*, que é dependente de σ^{54} (JIN et al., 2003).

Mais recentemente, Petnick-Ocwieja e colaboradores (2000) propuseram que apesar de não ter sido identificada uma sequência consenso, existe um padrão de composição de aminoácidos e hidrofobicidade na região N-terminal de proteínas secretadas pelo SSTT de *Pseudomonas syringae*. Baseando-se nesse padrão, foi feita uma busca em todo o genoma desta bactéria e novas proteínas secretadas por este sistema foram identificadas (PETNICKI-OCWIEJA et al., 2000).

Muitas proteínas secretadas pelo sistema tipo III necessitam pequenas proteínas citoplasmáticas, normalmente ácidas, com função de chaperonas. Estas ligam-se individualmente às proteínas secretadas, estabilizando-as e prevenindo interações prematuras com outros componentes do sistema. Elas também funcionam como um sinal alternativo para a secreção, pois ligam-se durante a tradução e liberam a proteína no momento da secreção. (GALAN & COLLMER, 1999; HUECK, 1998; AKEDA & GALÁN, 2005).

A infecção bacteriana na planta pode levar ao desenvolvimento da doença ou a reação de hipersensibilidade (HR). A reação de hipersensibilidade é uma resposta de defesa vegetal na qual ocorre necrose tecidual e formação de compostos fenólicos e agentes antimicrobianos no local de contato com o patógeno, prevenindo desta maneira, a disseminação do patógeno na planta (HUECK, 1998). Em plantas susceptíveis ocorre desenvolvimento de doença e em plantas resistentes ocorre um mecanismo de defesa denominado resposta de hipersensibilidade (HR). A escolha do processo depende da presença de pares de genes de resistência na planta e de avirulência no patógeno. O gene de resistência da planta (R) codifica um receptor para a proteína de avirulência da bactéria (Avr), sinalizando o início de uma cascata de eventos que resulta na reação de hipersensibilidade (RATHJEN et al.,

1999; MARTIN et al., 2003; ABRAMOVITCH et al., 2003). Na ausência do gene R, proteínas Avr contribuem para a virulência do patógeno (GU & MARTIN, 1998).

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (*Pst*) é o agente causador da doença pinta-bacteriana (também conhecida como mancha-bacteriana pequena ou pústula-bacteriana) em tomate e *Arabidopsis*. Esta bactéria utiliza o sistema de secreção tipo III para translocar aproximadamente 30 proteínas efetoras às células das plantas (ABRAMOVITCH et al., 2003; XIAO et al., 2007). Essas proteínas são essenciais para a patogênese e atuam alterando a fisiologia normal da célula eucariótica em benefício do patógeno.

Na interação entre *Pst* e plantas de tomate, a proteína de resistência do hospedeiro é Pto, uma serina/treonina quinase que interage diretamente com AvrPtoB e ativa a imunidade através de interação com a proteína Prf. Se uma das proteínas estiver ausente (Pto ou Prf), a planta torna-se suscetível (XIAO et al., 2007). Neste caso, AvrPtoB atua como fator de virulência suprimindo a imunidade das plantas (ABRAMOVITCH et al., 2003).

AvrPtoB é uma proteína modular de 59 kDa que possui atividades de patogenicidade e virulência. A porção C-terminal atua como fator de patogenicidade através de ubiquitinação da proteína Fen do hospedeiro, o que causa degradação desta e suscetibilidade da planta (JANJUSEVIC et al., 2006; ABRAMOVITCH & MARTIN, 2005). A região N-terminal possui duas atividades distintas de virulência: em plantas suscetíveis, AvrPto₁₋₃₀₇ é capaz de promover o crescimento bacteriano e potencializar os sintomas relacionados com uma produção de etileno aumentada. AvrPto₃₀₈₋₃₈₇ é requerida para uma segunda atividade de virulência que envolve a supressão da imunidade em *Arabidopsis* (XIAO et al., 2007).

Apesar dos sistemas de secreção de proteínas do tipo III possuírem um papel essencial na virulência de muitas proteobactérias patogênicas, eles também estão presentes em bactérias não patogênicas que se associam com plantas. Bactérias do solo dos gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* são simbiontes gram-negativos de leguminosas que induzem a formação de nódulos nas raízes. Nestas bactérias, sistemas de secreção do tipo III são utilizados como um mecanismo para enviar mensagens ao organismo eucarioto (MARIE et al., 2003).

1.2.3 Sistema Sec-dependente

Componentes estruturais do sistema Sec

O sistema Sec está envolvido na translocação de proteínas através da membrana citoplasmática e na inserção de proteínas integrais de membrana (FEKKES & DRIESSEN, 1999). Em *E. coli*, o sistema Sec é composto por várias proteínas de membrana interna (SecD, SecE, SecF, SecY), uma ATPase citoplasmática associada à membrana (SecA), uma chaperona (SecB), uma peptidase de sequência sinal periplasmática, além de um número de proteínas acessórias como SecD e SecF (HUECK, 1998). SecA possui 2 domínios de ligação a nucleotídeos trifosfato, cuja hidrólise fornece energia para o transporte. Entre os 2 domínios fica a região que se liga à pré-proteína e reconhece o peptídeo sinal (LEE & SCHNEEWIND, 2001).

SecY possui 10 regiões hidrofóbicas imersas na membrana. Com 48 kDa, é a maior subunidade de SecYEG, formando um poro através do qual as proteínas passam. Este complexo é o receptor de um dímero de SecA. SecE e G também

são proteínas de membrana. SecE atravessa a membrana 3 vezes e faz parte do poro. SecG estimula a secreção *in vitro*. Em condições de translocação, a proteína SecA aproxima dois dímeros de SecYEG formando um tetrâmero SecYEG que constitui um poro (PUGSLEY, 1993). SecYEG e SecA são conhecidos como translocase e são os componentes primários da maquinaria de translocação (MORI & ITO, 2001)

Todas as proteínas secretadas pela via Sec-dependente possuem peptídeo sinal, que funciona tanto no direcionamento quanto no reconhecimento do peptídeo pela translocase. O tamanho desta sequência varia de 18 a 30 resíduos de aminoácidos e pode ser dividida em 3 partes estruturalmente distintas: a região N-terminal, positivamente carregada (região N); a região central hidrofóbica (região H) e a região de clivagem, mais polar (região C). A sequência de aminoácidos dessas regiões não é bem conservada, mas suas características físicoquímicas são (FEKKES & DRIESSEN, 1999; TJALSMA et al., 2000).

Resíduos de lisina ou arginina são responsáveis pela carga líquida positiva na região N. Esta carga serve para orientar as proteínas corretamente em relação à bicamada lipídica. O potencial elétrico transmembrana ($\Delta\psi$, negativo dentro) previne a translocação de resíduos carregados positivamente e facilita os resíduos carregados negativamente. Desta maneira, o $\Delta\psi$ contribui para a topologia correta de proteínas de membrana, obedecendo a regra “positivo dentro” (VON HEIJNE, 1990).

O centro hidrofóbico da região H varia entre 7 e 15 resíduos. A hidrofobicidade total desta região contribui para a eficiência da translocação: a

eficiência aumenta com o aumento da hidrofobicidade desta região (CHOU & KENDALL, 1990).

A região C é o sítio de clivagem pelas peptidases de sinal. Esta é a única região que possui certa especificidade de sequência primária. São conhecidos dois tipos de peptidases de sinal: as do tipo I clivam pré-proteínas comuns enquanto que as do tipo II são específicas para lipoproteínas. Para sequências sinal que dependem de peptidases tipo I, as restrições estão nos resíduos localizados nas posições -1 e -3 em relação ao início da proteína madura. Esse domínio interage com a peptidase, que cliva a sequência sinal. Esses resíduos possuem cadeias laterais pequenas e neutras como alanina, glicina e serina, com uma preferência por alanina (VON HEIJNE, 1984). Lipoproteínas dependentes de peptidases tipo II possuem resíduos grandes e hidrofóbicos na posição -3, como por exemplo leucina e uma cisteína sempre está presente na posição +1. Após remoção da sequência sinal, esta é degradada por um número de peptidases (FEKKES & DRIESSEN, 1999).

Rotas de Direcionamento ao Sistema Sec

Direcionamento Mediado por SecB

Existem duas rotas para direcionamento das pré-proteínas até a maquinaria de translocação do sistema Sec. A maioria das pré-proteínas seguem uma rota de direcionamento pós-traducional, na qual a proteína precursora se mantém em um estado desnaturado devido à interação com a chaperona SecB. SecB forma tetrâmeros de 64 kDa (PUGSLEY, 1993) e é quem direciona as pré-proteínas à subunidade periférica de SecA do complexo de translocação heterotrimérico (SecYEG) na membrana citoplasmática (LEE & SCHNEEWIND, 2001).

Após a ligação do complexo pré-proteína-SecB à SecA, SecB é liberada para atuar em novos substratos (FEKKES & DRIESSEN, 1999). SecA atua de forma cíclica, transportando a pré-proteína através do poro em vários passos. Um domínio de SecA de aproximadamente 30 kDa insere-se pelo menos parcialmente, através da membrana, carregando um segmento de aproximadamente 25 resíduos de aminoácidos da pré-proteína (DOUVILLE et al., 1995). A hidrólise de ATP permite que SecA se dissocie da pré-proteína (ECONOMOU & WICKNER, 1994). SecA associa-se novamente e ocorre outro ciclo. O potencial elétrico da membrana auxilia na transferência da proteína através dos poros. O peptídeo sinal é a primeira parte a ser translocada, porém, a parte hidrofóbica fica retida na membrana. Assim que a proteína atinge o periplasma, uma peptidase de sinal cliva a sequência sinal (MORI & ITO, 2001; PUGSLEY, 1993; DRIESSEN et al., 2001).

Direcionamento Mediado pela Partícula de Reconhecimento de Sinal (SRP)

Esta via de direcionamento co-traducional envolve a partícula de reconhecimento de sinal (SRP). A SRP de *E. coli* é composta pela GTPase Ffh, de 45 kDa e pelo RNA 4.5S, de aproximadamente 100 pb (DRIESSEN et al., 2001).

A SRP reconhece a sequência sinal ou o segmento hidrofóbico transmembrana assim que ele emerge do ribossomo. O complexo ribossomo-pré-proteína e SRP (RNC) é então direcionado ao receptor FtsY de SRP, que fica ancorado à membrana interna. Essa interação aumenta a afinidade de Ffh e FtsY por GTP. O RNA 4.5S aumenta a afinidade de Ffh por sequências sinal e é essencial na interação entre SRP e seu receptor. A ligação de GTP a FtsY associado à membrana e/ou SRP dissocia o complexo RNC de SRP liberando a pré-

proteína para o complexo SecYEG (GU et al., 2003; MORI & ITO, 2001; PUGSLEY, 1993; DRIESSEN et al., 2001).

1.2.4 Sistema Tat-dependente

A maioria das proteínas periplasmáticas são exportadas pelo sistema Sec-dependente. Entretanto, existe um segundo mecanismo geral de exportação através do qual as pré-proteínas podem atravessar a membrana interna. Este sistema é independente de Sec e foi denominado TAT (*Twin Arginine Translocation*). (BERKS, 1996), pois os precursores são direcionados por peptídeos sinal. Estes peptídeos conservam a estrutura de 3 partes do peptídeo sinal tradicional, porém, possuem na região N-terminal um motivo conservado de 2 resíduos de arginina consecutivos e invariáveis (BERKS et al., 2000).

Em *E. coli*, o sistema Tat é composto por 4 proteínas integrais de membrana, denominadas TatA, B, C e E. (BOGSCH et al., 1998; PRESTON et al., 2005). Esta translocase funciona no transporte de proteínas em sua estrutura enovelada através da membrana citoplasmática (STANLEY et al., 2000; MÜLLER, 2004). Os requerimentos energéticos para secreção de proteínas pela via Tat derivam exclusivamente da força próton motriz (CLINE et al., 1992)

A sequência consenso para estes peptídeos tem sido definida como (S/T)-R-R-X-F-L-K localizada entre as regiões N e H, onde os resíduos de arginina são invariáveis e a frequência de ocorrência dos demais aminoácidos é de aproximadamente 50% (STANLEY et al., 2000; BERKS, 1996).

Análises recentes demonstraram que peptídeos sinal Tat bacterianos, diferentemente dos peptídeos sinal tipo Sec, possuem uma alta ocorrência de resíduos de prolina na posição -6 em relação ao sítio de clivagem. A região C de peptídeos Tat também contém aminoácidos básicos, (CRISTÓBAL et al., 1999), enquanto que precursores da via Sec possuem uma tendência maior para concentrar estes aminoácidos na vizinhança do sítio de clivagem. Os sinais Tat bacterianos são em média, 14 resíduos de aminoácidos mais longos que os peptídeos Sec, sendo que o tamanho adicional é devido a uma estendida região N. A região H de sequência sinal Tat-dependente é significativamente menos hidrofóbica que os de peptídeos Sec-dependentes devido à maior ocorrência de resíduos de aminoácidos glicina e treonina e menor abundância de leucina. Tais diferenças, fazem com que o peptídeo sinal seja capaz de mediar a escolha mutuamente exclusiva entre proteínas precursoras das vias Sec e Tat (STANLEY et al., 2000; CRISTÓBAL et al., 1999).

A via Tat é utilizada por proteínas que se ligam a cofatores redox como núcleos ferro-enxofre e molibdênio. Esses cofatores são inseridos nas apoproteínas ainda no citoplasma, o que requer enovelamento da proteína, impedindo que esta seja transportada pela via Sec-dependente (BOGSCH et al., 1998). Tais proteínas funcionam principalmente na cadeia de transporte de elétrons e são vitais no metabolismo energético bacteriano. Algumas proteínas que não ligam os cofatores citados podem também utilizar a via Tat de secreção, provavelmente porque requerem fatores citoplasmáticos para seu enovelamento ou por serem enoveladas muito rapidamente no citoplasma para serem transportadas pelo aparato Sec (BERKS et al., 2000).

1.2.5 Sistema de Secreção Tipo II

Esta via permite a secreção de uma grande variedade de enzimas degradativas como celulases, pectinases, proteases e toxinas como a aerolisina e a toxina do cólera (PY et al., 2001) por bactérias gram-negativas (HUECK, 1998; GONZÁLEZ-PEDRAJO & DREYFUS, 2003).

Após o transporte Sec-dependente ou Tat-dependente até o periplasma, a proteína perde o peptídeo sinal e adquire sua conformação nativa (se Sec-dependente). Do periplasma, as proteínas podem ser translocadas através da membrana externa pelo sistema tipo II (FILLOUX, 2004).

Este sistema é amplamente conservado em bactérias gram-negativas e é composto por um complexo de 12 a 16 proteínas, denominadas GspC-M, GspA, GspB, GspN, GspO, e GspS (JHA et al., 2005). A maioria dos componentes deste sistema são proteínas de membrana interna (PY et al., 2001) com domínio de ligação à ATP, que é citoplasmático ou periféricamente associado à membrana interna (LORY, 1998)

A proteína GspD é o principal componente da membrana externa. Esta forma um complexo multimérico e funciona como um poro através do qual as proteínas são secretadas ao espaço extracelular (FILLOUX, 2004; LEE et al., 2000). GspS é uma pequena lipoproteína também associada à membrana externa e forma um complexo com GspD (LEE et al., 2000).

As funções exatas das proteínas de membrana interna GspA e GspB não são conhecidas mas elas aparentemente auxiliam na translocação de GspD para a

membrana externa (JHA et al., 2005). GspG é a principal proteína tipo prepilina e ela adquire uma estrutura tipo *pilus*, denominada *pseudopilus*, juntamente com as subunidades GspH, I e J (FILLOUX, 2004).

GspE está localizada no lado citoplasmático da membrana interna. Possui um motivo característico de ligação a nucleotídeos e atividade autoquinásica (FILLOUX, 2004; LEE et al., 2000). As proteínas GspF, L, M e E formam um complexo na membrana interna que serve como uma plataforma na qual a pseudopilina é montada (PY et al. 2001). GspC e GspN atuam como interconectores entre o complexo da membrana externa (GspD e GspS) e o complexo da membrana interna (GspF, GspL, GspM e GspE). (FILLOUX, 2004).

1.2.6 Sistema de Secreção Tipo IV

O sistema de secreção tipo IV é homólogo aos sistemas de conjugação e ao sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens* que facilitam a translocação de DNA. É um sistema versátil que secreta tanto ácidos nucléicos como proteínas (CHRISTIE, 2001). O protótipo para exemplificar esta maquinaria de secreção é o transporte de DNA oncogênico e proteínas efetoras (nucleoproteínas) até o núcleo das células de plantas pelo fitopatógeno *A. tumefaciens*. O sistema é composto por 12 componentes denominados de VirB1 a VirB11 e VirD4, que transferem o complexo proteína-DNA do citoplasma da célula até a célula eucariótica em uma etapa através do *pilus-T* (CHRISTIE, 2001).

1.2.7 Sistema de Secreção tipo V

Autotransporte

O autotransporte é um ramo terminal do sistema geral de secreção e transporta uma grande variedade de proteínas com funções de protease, toxinas, adesinas e invasinas (HENDERSON et al., 2004).

Proteínas autotransportadas são sintetizadas como um único polipeptídeo que contém todas as informações necessárias para sua secreção. Estas proteínas são compostas por 3 regiões: o peptídeo sinal, o domínio de passagem e a unidade de translocação que forma um barril tipo β com uma estrutura de 10-18 folhas antiparalelas (DESVAUX et al., 2004; HENDERSON et al., 2004).

Após atravessar a membrana interna, a sequência sinal é processada originando um intermediário periplasmático. Posteriormente, a região β insere-se espontaneamente na membrana externa em uma configuração tipo barril β , onde a primeira e a última folha β anfipática formam pontes de hidrogênio, formando uma conformação tipo anel, através do qual é transportada a região de passagem. Na superfície celular, a proteína pode permanecer associada à membrana ou ser liberada ao meio extracelular através de um evento autoproteolítico (GONZÁLEZ PEDRAJO & DREYFUS, 2003; DESVAUX et al., 2004).

O sistema foi pioneiramente descrito para a secreção da protease IgA1 produzida por *Neisseria gonorrhoeae* (THANASSI & HULTGREN, 2000). Foi proposto que o barril β de uma região carboxi-terminal monomérica contém um canal hidrofílico através do qual a região amino-terminal desnaturada pode ser

translocada. Entretanto trabalhos mais recentes sugeriram que a região carboxi-terminal forma um complexo oligomérico com um poro central hidrofílico que é utilizado para secreção da sequência amino-terminal (HENDERSON et al., 2004).

Proteína acessória única (“*Single accessory*”)

Uma via alternativa requer uma proteína acessória para secreção através da membrana externa. A proteína acessória forma um poro tipo barril β na membrana externa através do qual as proteínas podem ser secretadas (THANASSI & HULTGREN, 2000). Esta via parece ser similar ao autotransporte, exceto que os domínios de passagem e o domínio β estão em proteínas diferentes.

Chaperona/*Usher*

A via chaperona/*Usher* é um ramo terminal do sistema geral de secreção dedicado à montagem e secreção de uma ampla faixa de estruturas adesivas de virulência na superfície de bactérias gram-negativas. A secreção por esta via requer apenas 2 componentes: uma chaperona periplasmática e uma proteína de membrana externa denominada *Usher* (THANASSI et al., 1998).

O protótipo de organelas que são montadas por esta via são os *pili* tipo I expressos pela *E. coli* uropatogênica. Após o transporte Sec-dependente através da membrana interna, subunidades do *pilus* interagem com a chaperona periplasmática por meio de um motivo C-terminal conservado, presente nas subunidades do *pilus*. A chaperona facilita a liberação de subunidades de pilus no periplasma e direciona o correto enovelamento (HENDERSON et al., 1998).

1.2.8 Sistema de Secreção Não-Clássico

O termo “secreção não clássica” foi proposto por Bendsten e colaboradores (2005) para designar proteínas que são secretadas sem sequência sinal aparente. O aparato de secreção deste sistema ainda não é conhecido. Tampouco se sabe se é apenas um ou vários sistemas de secreção. A única característica em comum é a presença extracelular destas proteínas e a falta de peptídeo sinal. Algumas proteínas, que possuem função citoplasmática possuem também função no ambiente extracelular, muitas vezes diferente daquela realizada na célula. Proteínas, que possuem funções não relacionadas em diferentes ambientes, têm sido denominadas proteínas *moonlighting* (JEFFERY, 1999).

A detecção de proteínas não clássicas no secretoma poderia ser atribuída à lise celular. Entretanto, diversas proteínas têm sido identificadas no ambiente extracelular por diferentes pesquisadores (HARTH et al., 1994; HARTH & HORWITZ, 1999; ANTELMAN et al., 2001; HIROSE et al., 2000; VITIKAINEN et al., 2004) sugerindo que elas são realmente exportadas pela célula intacta.

A secreção da glutamina sintetase (GS) pelo patógeno humano *Mycobacterium tuberculosis* foi o primeiro relato de secreção não clássica em bactérias (HARTH et al., 1994). Outra proteína secretada de modo não clássico é a superóxido dismutase (SODA) de *M. tuberculosis* (HARTH & HORWITZ, 1999).

Bacillus subtilis, cujo secretoma tem sido extensivamente estudado, também secreta diversas proteínas pelo mecanismo não clássico. Apesar dos diversos estudos com este microrganismo não terem chegado a um consenso a respeito da composição do secretoma, foi possível compilar uma lista de proteínas secretadas

em todas as condições experimentais. Estas proteínas não possuem peptídeo sinal e são portanto candidatas à secreção pelo mecanismo não clássico (HIROSE et al., 2000).

Exemplos de proteínas identificadas como extracelulares são: enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (enolase, piruvato desidrogenase, malato desidrogenase), metabolismo de aminoácidos (arginase e pirrolina-5-carboxilato desidrogenase), proteínas de quimiotaxia e motilidade (componente estruturais do flagelo), proteínas de detoxicação como a catalase e superóxido dismutase, fatores de alongação e GroEL (ANTELMAN et al., 2001; HIROSE et al., 2000; VITIKAINEN et al., 2004)

Bendsten e colaboradores (2005) analisaram uma lista de proteínas secretadas pelo mecanismo não clássico de diversos organismos. Apesar de não terem sido encontrados motivos de sequência conservada para esta classe de proteínas, elas podem ser distinguidas de proteínas exclusivamente citoplasmáticas por características como composição de aminoácidos, estrutura secundária e índice de instabilidade. O programa denominado SecretomeP foi desenvolvido para identificar proteínas desta classe (BENDSTEN et al. 2005).

1.3 *Herbaspirillum seropedicae*

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foi primeiramente isolada na cidade de Seropédica, Rio de Janeiro, por BALDANI et al. (1986). Pertence ao gênero *Herbaspirillum*, que recebeu essa denominação por apresentar bactérias pequenas em forma de espiral encontradas em associação com plantas herbáceas. Suas células são gram-negativas, geralmente vibrióides e às vezes helicoidais. *H.*

seropedicae geralmente possui dois flagelos polares, diâmetro de 0,6 a 0,7 μm e tamanho variando de 1 a 5 μm conforme o meio de crescimento (BALDANI et al., 1986).

Este organismo é um diazotrofo endofítico, não patogênico, membro da classe β das Proteobactérias que associa-se com diversas gramíneas de interesse na agricultura (REIS et al., 2000). Já foi isolado de raízes e caules de milho, trigo, sorgo, arroz e cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996). São organismos aeróbicos, capazes de fixar o nitrogênio atmosférico em condições de microaerofilia (FU & BURRIS, 1989).

O genoma de *H. seropedicae* estirpe Z78 foi sequenciado e anotado pelo consórcio GENOPAR. O genoma tem 5.418.348 pares de base. A identificação automática de ORFs potenciais seguida de análise manual revelou um total de 4.720 genes. O genoma do *H. seropedicae* mostrou alta similaridade com os de outras β -proteobactérias especialmente *Janthinobacterium* sp., *Ralstonia* spp. especialmente *Janthinobacterium* sp., *Ralstonia* spp. e *Burkholderia* spp. O banco de dados de sequencia e anotação foi disponibilizado para este trabalho pela coordenação do GENOPAR.

O processo de interação planta-bactéria em organismos como *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium* tem sido estudado em mais detalhes. Estes formam interação simbiótica com plantas leguminosas. A simbiose inicia-se pela formação de nódulos na raiz ou caules em resposta à presença da bactéria. Moléculas sinalizadoras, como os lipo-oligossacarídeos, são secretadas pela bactéria e possuem papel essencial neste

processo (PERRET et al., 2000; VIPREY et al., 1998; HUNGRIA, 1994). As bactérias penetram no córtex, induzem a formação de nódulos na raiz, multiplicam-se e subsequentemente diferenciam-se em bacteróides, produzindo o complexo enzimático da nitrogenase. Dentro dos nódulos das raízes, a planta proporciona um ambiente com baixa concentração de oxigênio, que permite que a nitrogenase bacteriana converta nitrogênio atmosférico em amônia. Em contrapartida, a planta provê a bactéria com fontes de carbono (BLOEMBERG et al., 2001).

O processo de colonização por *H. seropedicae* ocorre através da ligação da bactéria à superfície da planta, seguida por sua proliferação, preferencialmente nos pontos de emergência de raízes secundárias e ferimentos. O espalhamento das bactérias ocorre através dos espaços intercelulares com posterior ocupação do xilema (RONCATO-MACCARI, 2003).

1.4 JUSTIFICATIVA

O sequenciamento do genoma de *H. seropedicae* mostrou que esta bactéria possui genes homólogos aos sistemas Sec-dependente (sistema tipo II, autotransporte, proteína acessória e chaperona *Usher*) sistemas Sec-independentes tipo I, tipo III e Tat-dependente. Entretanto, ainda não foram feitos estudos a respeito da funcionalidade destes sistemas ou da composição do secretoma deste organismo. Adicionalmente, proteínas extracelulares podem fazer contato com a célula eucariótica, participando da troca de sinais moleculares que ocorre durante o processo de interação planta-bactéria, cujo mecanismo detalhado ainda não é bem conhecido em *H. seropedicae*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o proteoma celular, o padrão de proteínas secretadas por *H. seropedicae* e os possíveis mecanismos envolvidos na secreção de proteínas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir um mapa 2D de referência de proteínas celulares de *H. seropedicae* com o maior número possível de proteínas identificadas;
- Construir um mapa 2D de referência de proteínas secretadas pela estirpe selvagem, SmR1, de *H. seropedicae* com o maior número possível de proteínas identificadas;
- Identificar os possíveis sistemas de secreção das proteínas secretadas por *H. seropedicae in silico*
- Realizar análises comparativas entre os secretomas das estirpes selvagem SmR1 as estirpes mutantes RAMHN1 (*hrcN*) e seus transconjugantes contendo o plasmídeo p173;
- Verificar se HrpL expressa constitutivamente é capaz de induzir o sistema de secreção tipo III de *H. seropedicae*;
- Identificar condições de cultivo capazes de induzir o sistema de secreção tipo III;

- Verificar a funcionalidade do sistema de secreção tipo III *in vivo* utilizando o modelo biológico do tomateiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1.

TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

| GENÓTIPO/FENÓTIPO | | REFERÊNCIA/FONTE |
|-----------------------|--|-------------------------|
| ESTIRPES | | |
| <i>H. seropedicae</i> | | |
| SmR1 | Estirpe selvagem, Sm ^R , Nif ⁺ | SOUZA et al., 2000 |
| RAMHN1 | Estirpe SmR1, Sm ^R , EZ::TN TM <TET-1> <i>hrcN</i> | MONTEIRO, não publicado |
| SmR1-pDS1 | Estirpe SmR1, Sm ^R , Tc ^R contendo o plasmídeo pLAFR3.18- <i>hrpL</i> | este trabalho |
| SmR1-173 | Estirpe SmR1, Sm ^R , Km ^R contendo o plasmídeo pDSK519-173 | este trabalho |
| <i>hrcN</i> -173 | Estirpe RAMHN1, Sm ^R , Tc ^R , Km ^R contendo o plasmídeo pDSK519-173 | este trabalho |
| <i>E. coli</i> | | |
| DH10B | Sm ^R ; F' [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15] | SAMBROOK et al., 1989 |
| S17.1 | Sm ^R Tra ⁺ | SIMON, et al., 1983 |
| PLASMÍDEOS | | |
| pLAFR3.18 | Tc ^R , vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ18R | MACHADO, 1996 |
| pDS1 | Contém um fragmento de 800pb com o gene <i>hrpL</i> de <i>H.seropedicae</i> em pLAFR3.18 | este trabalho |
| pPET29a | Vetor de expressão, promotor T7 | NOVAGEN |

| | | |
|----------------------|---|----------------------------------|
| pPET29a- <i>hrpL</i> | PET29a com o gene <i>hrpL</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado nos sítios <i>XbaI/HindIII</i> | SOUZA, não publicado |
| pDSK519-173 | Km ^R , vetor de ampla faixa hospedeira. Contém o gene que codifica para a proteína AvrPtoB de <i>P. syringae</i> sob controle do promotor nativo (<i>hrp</i>). | BAUER, D.W. (Cornell University) |

3.2 MEIOS DE CULTIVO PARA BACTÉRIAS

O meio de cultivo utilizado para crescimento das diversas estirpes de *H. seropedicae* foi o NFb-Malato cuja composição é a seguinte (MACHADO et al., 1991):

| | g/L |
|---|-------------------------|
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 0,2 |
| NaCl | 0,1 |
| CaCl ₂ | 0,02 |
| NTA | 0,056 |
| FeSO ₄ . 7H ₂ O | 0,02 |
| Biotina | 1x10 ⁻⁴ |
| Malato | 5 |
| Solução de oligoelementos | |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 2,0 x 10 ⁻³ |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 2,35 x 10 ⁻³ |
| H ₃ BO ₃ | 2,8 x 10 ⁻³ |
| CuSO ₄ . 5H ₂ O | 8,0 x 10 ⁻³ |
| ZnSO ₄ . 7H ₂ O | 2,4 x 10 ⁻³ |

A solução de fosfatos concentrada possui a seguinte composição:

| | g/L |
|---------------------------------|-------|
| K ₂ HPO ₄ | 17,8 |
| KH ₂ PO ₄ | 159,5 |

A mistura de fosfatos e o NH₄Cl mol/L foram autoclavados separadamente durante 20 minutos. No momento do uso foram adicionados 50 mL/L de solução de fosfatos e 20 mmol/L de NH₄Cl como fonte de nitrogênio. O meio com fosfatos e nitrogênio é denominado NFbHPN-malato. Para o meio sólido foram adicionados 15 g/L de ágar e para o semi-sólido 1,5 g/L.

O meio de cultivo utilizado para crescimento de *Escherichi coli* foi o meio Luria Bertani (LB), cuja composição é a seguinte (SAMBROOK et al., 1989):

| | g/L |
|---------------------|------|
| Extrato de levedura | 5,0 |
| Cloreto de sódio | 10,0 |
| Triptona | 10,0 |

O pH do meio LB foi ajustado com NaOH para 7,0. O meio sólido (LA) foi obtido pela adição de 15 g/L de ágar ao meio LB.

Antibióticos

As concentrações utilizadas de antibiótico foram as seguintes:

| | $\mu\text{g/mL}$ |
|-----------------------|------------------|
| <i>H. seropedicae</i> | |
| Estreptomicina (Sm) | 80 |
| Canamicina (Km) | 1000 |
| Tetraciclina (Tc) | 10 |
| <i>E. coli</i> | |
| Ampicilina (Amp) | 200 |
| Canamicina (Km) | 50 |
| Cloranfenicol (Cm) | 30 |
| Tetraciclina (Tc) | 10 |

A ampicilina, canamicina e estreptomicina foram dissolvidas em água milli-Q e esterilizadas por filtração. O cloranfenicol e a tetraciclina foram solubilizados em etanol 95%.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Todas as estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFbHPN-malato a 30°C e 120 rpm de agitação por um período que variou entre 12 e 16 horas. Todas as estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB a 37°C e 150 rpm.

3.4 PREPARO DA AMOSTRA

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHPN-malato durante um período de aproximadamente 16 horas até atingir D.O.₆₀₀ entre 1,0 e 1,4.

3.4.1 Proteínas secretadas

As culturas (200 mL) foram centrifugadas durante 20 minutos (20.000 g, 2°C) e a solução sobrenadante foi coletada e filtrada em membrana com poro 0.45 µm para remoção de células residuais. As proteínas extracelulares da solução sobrenadante foram precipitadas (16 horas, 4°C) com TCA 100% para concentração final de 12%. A mistura foi então centrifugada por 45 minutos a 10.000 g, 2°C. O precipitado foi lavado 3 vezes com acetona -20°C e depois os tubos permaneceram abertos durante 2 horas para secar completamente. O precipitado foi então dissolvido em solução de lise (7 mol/L uréia, 2 mol/L tiouréia, 4% CHAPS e 0,5% Pharmalyte pH 3 – 10).

3.4.2 Proteínas de membrana

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em 50 mL de meio NFbHPN-malato até D.O.₆₀₀ aproximadamente 1,0. As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm, 8 minutos), ressuspensas em 800 µL de tampão SP (NaCl 8.5 g/L; K₂HPO₄ 7 g/L; KH₂PO₄ 3 g/L; pH 7.2) e sonicadas com 15 pulsos de 15 seg com 15 seg de intervalo. O extrato celular foi centrifugado (13.000 rpm, 10 minutos, 4°C). A solução sobrenadante foi retirada com cuidado e submetida a ultracentrifugação (250.000g 30 minutos, 4°C) em ultracentrifuga Hitachi Himac CP90B (rotor P50A2). O precipitado foi lavado com 1mL de tampão SP e ultracentrifugado novamente nas mesmas condições. O precipitado foi dissolvido em 100 µl de solução de lise (7 mol/L urea, 2 mol/L tiouréia, 4% CHAPS e 0,5% Pharmalyte pH 3 – 10) e armazenado a -70°C.

3.4.3 Proteínas celulares

As células de *H. seropedicae* (50 mL) foram coletadas por centrifugação (5000g. 10min, 4°C). Em seguida foram lavadas uma vez em solução 3,0 mmol/L KCl, 1,5 mmol/L KH₂PO₄, 68 mmol/L NaCl e 9,0 mmol/L NaH₂PO₄. O precipitado foi ressuspensionado em 600 µL de tampão 10 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 1,5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L e KCl, 0,5 mmol/L DTT. Solução estoque de PMSF foi preparada em isopropanol (100 mg/mL) e armazenada em -20°C. No momento do uso, esta foi adicionada ao tampão para uma concentração final de 0,5 mmol/L. As amostras foram aliqüotadas e armazenadas a -70°C até o momento do uso.

As células foram lisadas com uma solução contendo 7,0 mol/L uréia, 2,0 mol/L tiouréia, 2% (p/v) CHAPS, 0,8% (p/v) Pharmalyte pH 3-10 e 1% (p/v) DTT (GÖRG et al., 2003) por sonicação em banho de gelo (5 x 20 segundos, sonicador “*Ultrasonic Processor XL Heat Systems*) e em seguida centrifugadas (2 minutos, 13.800 g).

3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada segundo a técnica descrita por Bradford (1979) utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). Devido à interferência da solução de lise nesta técnica, a solução de lise (mesmo volume da amostra a ser dosada) foi adicionada ao branco.

3.6 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

3.6.1 Isoeletrofocalização

A isoeletrofocalização (IEF) das proteínas foi realizada em tiras de 13 cm com gradiente imobilizado de pH (IPG) utilizando equipamento IPGphor (GE Healthcare).

As amostras (250 μ L) foram aplicadas nas tiras IPG em solução de rehidratação contendo 8 mol/L uréia, 0,5% CHAPS, 0,2% de tampão IPG, 15 mmol/L DTT e traços de azul de bromofenol (GÖRG et al., 2003) ou a solução DeStreak, comercialmente disponível (GE Healthcare).

A rehidratação foi realizada no equipamento IPGphor a 20°C durante 12 horas. A isoeletrofocalização foi iniciada logo após o término da rehidratação. Para proteínas celulares e proteínas secretadas foram feitas três etapas de 500 Vhr, 1000 Vhr e 14500 Vhr, totalizando 16000 VhT. Proteínas de membrana foram rehidratadas durante 13 horas, a 20°C com 30V. Em seguida, a isoeletrofocalização foi feita em 5 etapas de 400V, 30 minutos, 1000V, 30 minutos, 2000V, 30 minutos, 4000V, 30 min e 40000 Vhr, totalizando 43700 Vht. Após a IEF as tiras foram imediatamente equilibradas ou armazenadas em congelador -70°C para posterior utilização.

3.6.2 Equilíbrio das tiras IPG

Após a isoeletrofocalização as tiras foram equilibradas em 5 mL de tampão de equilíbrio (50 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L uréia, 30% (p/v) glicerol e 2% (p/v) SDS em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8, 50 μ L de solução de azul de bromofenol

0,25% (p/v)) e 50 mg de DTT por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as tiras foram equilibradas na mesma solução por 15 minutos, sendo o DTT substituído por 200 mg de iodoacetamida.

Após as duas etapas de equilíbrio as tiras foram submersas por 5 minutos em tampão de corrida (LAEMMLI, 1970) e imediatamente submetidas à segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

3.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS- PAGE)

Eletroforese das proteínas em géis SDS-PAGE unidimensionais foi realizada utilizando o a cuba Hoefer SE 600 Ruby (GE Healthcare) conforme a metodologia descrita por LAEMMLI (1970).

Para géis bidimensionais, SDS-PAGE foi realizada em géis de 18 cm x 16 cm na cuba Ruby da GE Healthcare. As tiras IPG foram mergulhadas por alguns minutos no tampão de corrida e em seguida posicionadas horizontalmente no topo do gel e cobertas com 2 mL de solução de agarose morna (0,5% agarose, 1% SDS e traços de azul de bromofenol) para selar. A eletroforese foi feita limitando-se a corrente a 45 mA/gel até o azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel. A temperatura foi mantida a 15 °C por meio de refrigeração com circulador termostático Multitemp II.

3.6.4 Visualização dos géis e captura das imagens

Foi utilizada coloração com Coomassie coloidal (WESTERMEIER & HAVEN, 2004) ou coloração com nitrato de prata (SHEVCHENKO et al., 1996)

Para corar com Coomassie coloidal, as proteínas foram fixadas ao gel durante 60 minutos com uma solução contendo 1,3% (w/v) ácido fosfórico e 20% (v/v) metanol. Após esta etapa, o gel foi corado por um período de 12 a 16 horas em solução contendo 1,5% ácido fosfórico, 7,7% sulfato de amônio e 0,01% Coomassie G-250.

Para coloração com prata, os géis bidimensionais permaneceram durante 1 hora em solução contendo 50% metanol, 12% ácido acético e 0,5 mL/L formaldeído 37%. Em seguida, os géis foram tratados por 2 vezes durante 20 minutos em etanol 50%, 20 minutos em etanol 30% e 1 minuto em 0,2 g/L tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Os géis foram então lavados 3 vezes com água destilada durante 20 segundos e tratados por 10 minutos com solução de nitrato de prata 2 g/L contendo 0,75 mL de formaldeído 37%. Finalmente foi adicionada solução de carbonato de sódio 60 g/L (Na_2CO_3), 0,5mL formaldeído 37% e 4 mg de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) até aparecimento das bandas protéicas. Para parar a reação foi utilizada solução de ácido acético 12%.

3.6.5 Análise computacional dos géis

As imagens dos géis bidimensionais foram digitalizadas utilizando câmara CD Biochemi (UVP) ou digitalizador Labscan (GE Healthcare). As análises dos géis bidimensionais foram feitas utilizando o Programa ImagemasterTM Platinum v. 6.0 (GEHealthcare). O gradiente de pH do gel foi calibrado conforme a faixa de pH da tira utilizada e a massa molecular foi calculada utilizando marcadores com massa molecular conhecida entre 14 e 96 kDa (GE Healthcare).

3.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

3.7.1 Preparo da Amostra

Proteínas foram retiradas do gel manualmente utilizando uma ponteiras novas estéreis tipo P1000 e colocadas em tubos tipo eppendorf. A descoloração dos géis foi feita utilizando solução 75 mmol/L bicarbonato de amônio em 40% etanol em quantidade suficiente para cobrir os pedaços de gel e este procedimento foi repetido até descoloração completa dos géis. Em seguida, o fragmento de gel foi desidratado com 30 µl de acetonitrila 100% por 5 minutos e secado em centrífuga a vácuo durante 20 minutos a 30°C.

A digestão das proteínas foi feita com 10 µl de solução de tripsina (10 µg/ml em tampão 40 mmol/L bicarbonato de amônio pH 8,0 contendo 10% acetonitrila). Após completa rehidratação, as amostras foram retiradas do gelo e foram adicionadas de mais 10 µl de tampão 40 mmol/L bicarbonato de amônio pH 8,0 contendo 10% acetonitrila e as amostras permaneceram em estufa a 37°C por um período de 14 a 16h.

Os peptídeos trípticos foram extraídos do gel com 30 µl de solução de extração contendo 50% acetonitrila e 5% ácido trifluoracético por 30 minutos a temperatura ambiente ou 10 minutos usando ultrasom. O procedimento foi repetido duas vezes e as soluções sobrenadantes foram concentradas a vácuo até um volume de aproximadamente 10 µl.

Quando necessária, a purificação dos peptídeos foi feita utilizando uma ponteira com uma coluna de fase reversa "PerfectPure C-18 Tip" (Eppendorf). A

ponteira foi pré-umidificada duas vezes com 10 µl de 50% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético e equilibrada duas vezes com 10 µl de 0,1% ácido trifluoracético. Em seguida, a amostra foi aspirada e expelida dez vezes. A amostra foi lavada três vezes com 0,1% ácido trifluoracético para retirar contaminantes e os peptídeos foram eluídos da coluna diretamente na placa para análise por Maldi-ToF (MTP384 Bruker Daltonics) em 2 µl de 50% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético saturada com matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico).

3.7.2 Obtenção e análise dos espectros de massa dos peptídeos trípticos

As massas dos peptídeos trípticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-TOF/MS modelo Autoflex II (Bruker Daltonics). O programa de computador utilizado foi FlexControl 2.0 (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 ns entre o pulso de laser e aplicação da voltagem, e faixa de aquisição entre 800 – 3200 Da. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina, substância P, bombesina, ACTH e somatostatina) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50 Da e 2211,10 Da) quando presentes. A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics). Os picos monoisotópicos foram detectados utilizando-se o algoritmo SNAP e relação sinal/ruído igual a 6.

Dados de fragmentação de peptídeos (espectro MS/MS) foram obtidos utilizando um Espectrômetro de massa MALDI-ToF/ToF/MS/MS tipo Autoflex II (Bruker Daltonics). O programa de computador utilizado foi o FlexControl 3.0

(Bruker Daltonics). O espectro MS foi obtido utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente e o espectro MS/MS foi obtido utilizando os parâmetros especificados pelo método LIFT do programa FlexControl v.3.0.

3.7.3 Identificação das Proteínas

Para identificação das proteínas, foi utilizado o programa ProteinProspector v.2.0, instalado localmente e o banco de dados completo de proteínas anotadas a partir da sequência do genoma de *H. seropedicae*. Os parâmetros de busca utilizados foram os seguintes: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. A tolerância máxima permitida foi de 200 ppm. Picos de tripsina e queratina foram excluídos previamente à busca.

A identificação foi considerada positiva quando o Mowse score da primeira candidata foi pelo menos 100x superior à segunda candidata, cobertura mínima de 20% e dados de pI e MM condizentes com os dados obtidos do gel.

3.8 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Para determinação do peptídeo sinal presente em algumas proteínas foi utilizado o programa SignalP 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP). Para peptídeos com sinal TAT-dependente foi utilizado o programa TatP 1.0. Proteínas secretadas pela via não clássica foram preditas usando o programa SecretomeP 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP). A localização celular de proteínas foi predita utilizando o programa PSORTb 2.0.4 (<http://www.psort.org/psortb>)

3.9 MINI-PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS

A purificação de plasmídeos foi feita pelo método de lise alcalina, modificado de SAMBROOK e colaboradores (1989). As estirpes de *E. coli* com o plasmídeo de interesse foram cultivadas em meio LB por 12-16 horas a 37°C. As células (1,5 mL) foram coletadas por centrifugação a 13.000 g por 90 segundos e ressuspensas em 150 µl de solução contendo Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glicose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L (GET). A lise celular foi feita com 150 µl de solução de NaOH 0,2 mmol/L e SDS 1% (m/V). A precipitação das proteínas e DNA cromossomal foi feita com 150 µl de solução acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 a 4°C durante 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 15 minutos. A solução aquosa foi extraída com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com 0,6 volume de álcool isoamílico (13.000 g, 20 minutos), lavado com etanol 70%, seco à vácuo e dissolvido em 30 µl água ultra-pura estéril.

3.10 ELETROFORESE DE DNA

A eletroforese de DNA foi feita em géis de ágar ou agarose 1 ou 1,5% conforme descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989), utilizando tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mmol/L e EDTA 2 mmol/L pH 8,0). Os géis foram tratados com solução 0,4 µg/mL de brometo de etídeo e o DNA foi visualizado em transluminador ultravioleta de 312 nm utilizando câmara CCD (sistema Biochemi, UVP).

3.11 DIGESTÃO DE DNA UTILIZANDO ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O procedimento de digestão de DNA variou conforme a enzima utilizada. Para cada enzima foi utilizado tampão próprio e o período de restrição variou entre 2 – 4 horas, 37°C, conforme as instruções do fabricante.

3.12 LIGAÇÃO DO DNA

Para ligação do DNA foi utilizada uma razão 1:5 (vetor:inserto), T4 DNA ligase e tampão próprio da enzima, especificado pelo fabricante. A reação foi incubada durante 16h a 4°C.

3.13 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES DE *H. seropedicae*

As culturas de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHPN-malato até uma D.O.₆₀₀ entre 0,6 e 0,9. As células foram coletadas por centrifugação e lavadas uma vez com 20 mL de água estéril gelada. Em seguida, foram ressuspensas em 20 mL glicerol 15%, centrifugadas e ressuspensas em 100 µl de glicerol 15% para uso no mesmo dia. Todas as etapas de centrifugação foram feitas a 2.500 x g durante 6 minutos a 4°C e as células foram mantidas em gelo durante todo o processo

3.14 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES DE *E. coli*

As culturas de *E. coli* foram crescidas até D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com 50 mL de água estéril gelada, ressuspensas em 20 mL de glicerol 15%, centrifugadas novamente e

ressuspensas em 200 µl de glicerol 15%. As células foram usadas no mesmo dia ou aliquotadas e armazenadas a -70 °C. Todas as etapas de centrifugação foram feitas a 2.500 x g durante 5 minutos, 4°C e as células foram mantidas em gelo durante todo o processo.

3.15 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

Para eletroporação, 40 µL de células eletrocompetentes foram misturadas com um volume de 1 a 5 µL de plasmídeo. As células foram submetidas a choque (4 KΩ, 320 µF) em cubetas de eletroporação. Após o choque, as células de *E. coli* foram ressuspensas em 1 mL de LB e foram incubadas a 37°C durante 30 minutos para recuperação. Células de *H. seropedicae* foram ressuspensas em meio NFbHPN-malato e incubadas a 30°C durante 6 horas para recuperação. Após a recuperação, células de *H. seropedicae* foram plaqueadas em meio NFbPN-malato sólido e células de *E. coli* foram plaqueadas em meio LA sólido na presença do(s) antibiótico(s) apropriado(s).

3.16 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Para transferência de plasmídeos por conjugação foi utilizada a estirpe S17.1 de *E. coli* como doadora do plasmídeo de interesse, previamente inserido por eletroporação. *H. seropedicae* e *E. coli* foram cultivados nos respectivos meios até uma D.O.₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. Em seguida, foram misturados 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli* S17 contendo o plasmídeo a ser transferido e as células foram plaqueadas como uma gota em meio LA/NFbHPN-malato (1:3) e incubadas a 30 °C durante 24 horas. As células foram raspadas,

ressuspensaa em 1 mL de NFb-malato e plaqueada em meio NFbHPN-malato com o antibiótico adequado.

3.17 CONSTRUÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 – 173 E *hrcN*-173

O plasmídeo pDSK519-173 foi transformado nas estirpe SmR1 e RAMHN1 (RAMHN1) de *H. seropedicae*. A seleção das estirpes contendo plasmídeo foi feita em meio sólido NFb-Malato contendo antibiótico canamicina (1000 µg/mL).

Para confirmar a presença dos plasmídeo nas células de *H. seropedicae*, estes foram extraídos conforme o item 3.9, transformados por eletroporação em células TOP10 de *Escherichia coli* e analisados em gel de agarose 1%.

3.18 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pDS1

Um fragmento *Xba*/*Hind*III de aproximadamente 800pb contendo o gene *hrpL* previamente clonado (SOUZA, não publicado) nos sítios *Nde*I/*Bam*HI do plasmídeo pET29a foi subclonado em pLAFR3.18 nos sítios *Xba*I/*Hind*III originando o plasmídeo pDS1. A seleção de transformantes contendo os plasmídeos recombinantes foi feita em meio sólido LA contendo o antibiótico tetraciclina (10 µg/mL) e X-gal.

3.19 CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS PLANTAS DE TOMATE

Foram utilizadas sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Santa Cruz Kada Gigante da marca Feltrin. A esterilização das sementes foi feita por imersão em etanol 70% durante 5 minutos seguida por imersão em hipoclorito de

sódio 1%, Tween-200 0,02% durante 20 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas 8 vezes com água destilada estéril.

As sementes foram cultivadas diretamente em substrato para hortaliças plant max (Eucatex agro) previamente autoclavado em potes de plástico. As plantas foram cultivadas em estufa incubadora com fotoperíodo de 12h ou em casa de vegetação com iluminação natural e temperatura entre 23 e 27°C. A irrigação foi realizada a cada dois dias utilizando a solução nutritiva de Broughton e Dilworth (1971) descrita a seguir, diluída 4 vezes:

| | g/L |
|--|------------|
| CaCl₂·2H₂O | 294,1 |
| KH₂PO₄ | 136,1 |
| Citrato férrico | 6,7 |
| MgSO₄·7H₂O | 123,3 |
| K₂SO₄ | 87,0 |
| MnSO₄·H₂O | 0,338 |
| H₃BO₄ | 0,247 |
| ZnSO₄·7H₂O | 0,288 |
| CuSO₄·5H₂O | 0,100 |
| CoSO₄·7H₂O | 0,056 |
| Na₂MoO₄·2H₂O | 0,048 |

Após o preparo, foram adicionados 0,2 mmol/L de NH₄NO₃ e a solução foi autoclavada por 20 minutos a 120°C.

3.20 INOCULAÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE COM *H. seropedicae*

Os experimentos de inoculação das plantas foram realizados após um período de 7 a 9 semanas de crescimento. Foram utilizadas as estirpes selvagem SmR1, e mutantes RAMHN1 (*hrcN*), *hrcN*-173 e SmR1-173.

As estirpes de *H. seropedicae* cultivadas em meio NFb-Malato contendo 50 mmol/L de solução de fosfatos (159,5 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4) e 20 mmol/L de cloreto de amônio durante 16h, a 30°C e 120 rpm de agitação. Após este período, as culturas foram diluídas para uma densidade ótica igual a 0,5 e voltaram ao agitador até atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,8 -1,0.

No experimento número 1, cinco microlitros de cultura foram adicionados sobre um pequeno furo feito na folha. No experimento 2, aproximadamente 200 µL de cultura foram inoculados na nervura da face dorsal das folhas utilizando uma seringa hipodérmica. No experimento 3, as células de *H. seropedicae* foram centrifugadas, lavadas 1x com água estéril e ressuspensas em meio malato. A D.O.₆₀₀ foi ajustada para aproximadamente 0,8 e a inoculação foi feita do mesmo modo que o experimento 2.

3.20.1 Preparo de extrato de lise de SmR1-173

A estirpe SmR1-173 foi cultivada em 20 mL de meio NFbHPN-malato durante 16 horas até atingir uma D.O.₆₀₀ = 1,44. A cultura foi lisada através de 15 ciclos de sonicação de 20 seg com 15 seg de intervalo em banho de gelo. Após centrifugação (10 minutos, 8000 x g), a solução sobrenadante foi filtrada em membrana com poro de 0,45 µm e foi feita dosagem de proteínas conforme Bradford

(1976). Aproximadamente 16 µg de proteína foram inoculadas na nervura da parte posterior das folhas utilizando seringa hipodérmica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

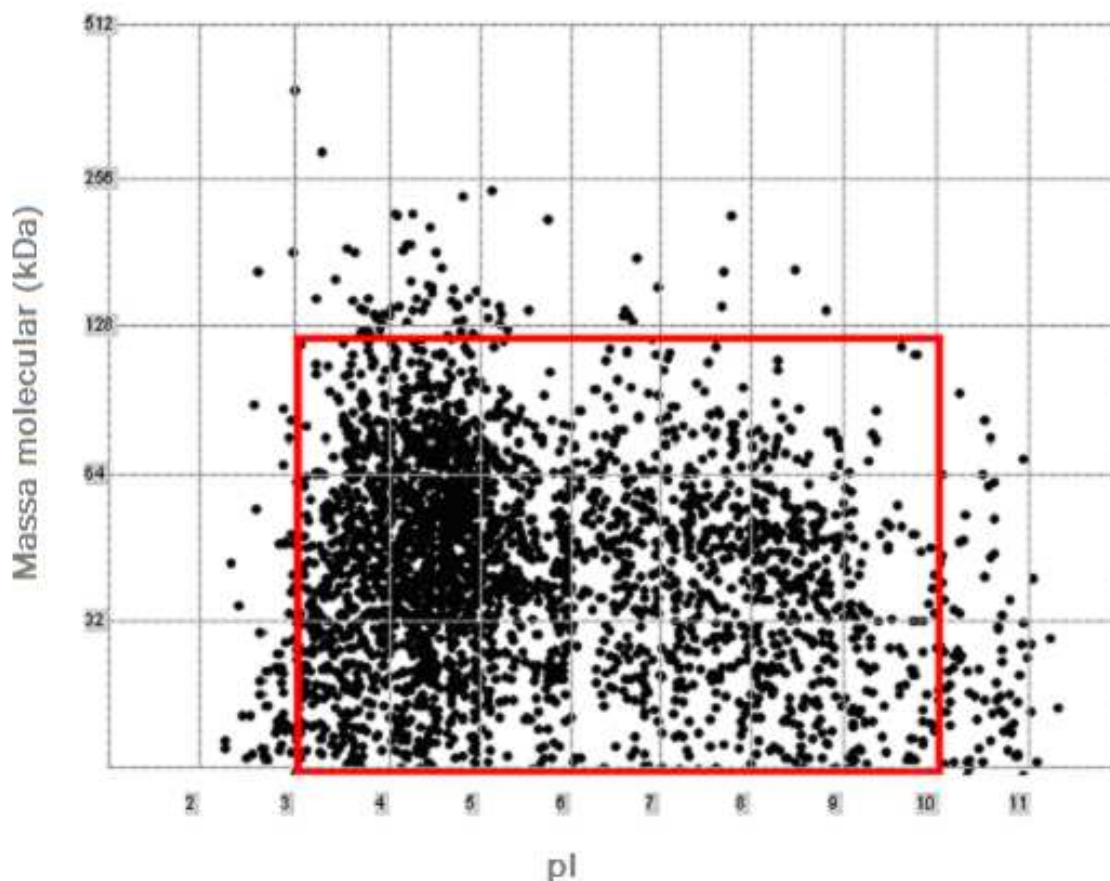
4.1 MAPA BIDIMENSIONAL REPRESENTATIVO DAS PROTEÍNAS CELULARES DE *H. seropedicae*

4.1.1 Mapa teórico das proteínas de *H. seropedicae*

A primeira etapa do trabalho consistiu em determinar a faixa de pH e massa molecular para a determinação do proteoma de referência das proteínas citosólicas do *H. seropedicae* que contivesse o maior número possível de proteínas anotadas do genoma. Utilizando o programa JvirGel v2.0 (www.jvirgel.de/index.html) e considerando os parâmetros para bactérias gram-negativas, excluindo proteínas secretadas ou proteínas de membrana, e o genoma de *H. seropedicae* determinado pelo GENOPAR, realizamos a previsão do gel de referência teórico. Neste gel 79% das proteínas apresentaram pl teórico entre pH 3 e 10 e massa molecular entre 15 e 100 kDa (figura 3). Assim, a faixa de pH de 3 a 10 foi escolhida para isoeletrofocalização na construção do mapa de referência de *H. seropedicae*. O limite de massa molecular foi escolhido como 100.000 Da.

O gel de referência de *H. seropedicae* cultivado em meio com excesso de amônio foi construído com proteínas identificadas por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF em vários géis experimentais. Para mapear a posição destas proteínas em um único gel, denominado gel de referência sintético, resultados da análise de 4 géis experimentais diferentes na faixa de pH 3 – 10 foram analisados pelo programa Imagemaster Platinum v.5.0. Este gel foi usado para calcular o pl e MM experimental para todas as proteínas identificadas (figura 3).

FIGURA 3 - MAPA TEÓRICO DO PROTEOMA COMPLETO DE *H. seropedicae*



Distribuição teórica das proteínas anotadas no genoma de *H.seropedicae*. Os cálculos foram feitos utilizando o programa JvirGel v2.0. O retângulo indica a janela analítica utilizada nos procedimentos experimentais. Excluindo proteínas secretadas e proteínas de membrana, 79% das proteínas do proteoma predito está representado na janela em destaque.

No total foram detectadas 242 bandas protéicas e destas, 207 foram identificadas por espectrometria de massas representando 177 proteínas diferentes. A cobertura média de cada proteína em termos de peptídeos trípticos usados na identificação das proteínas presentes no genoma do *H. seropedicae* foi de 33%. As proteínas identificadas estão marcadas no mapa bidimensional (figura 4) e listadas no anexo I.

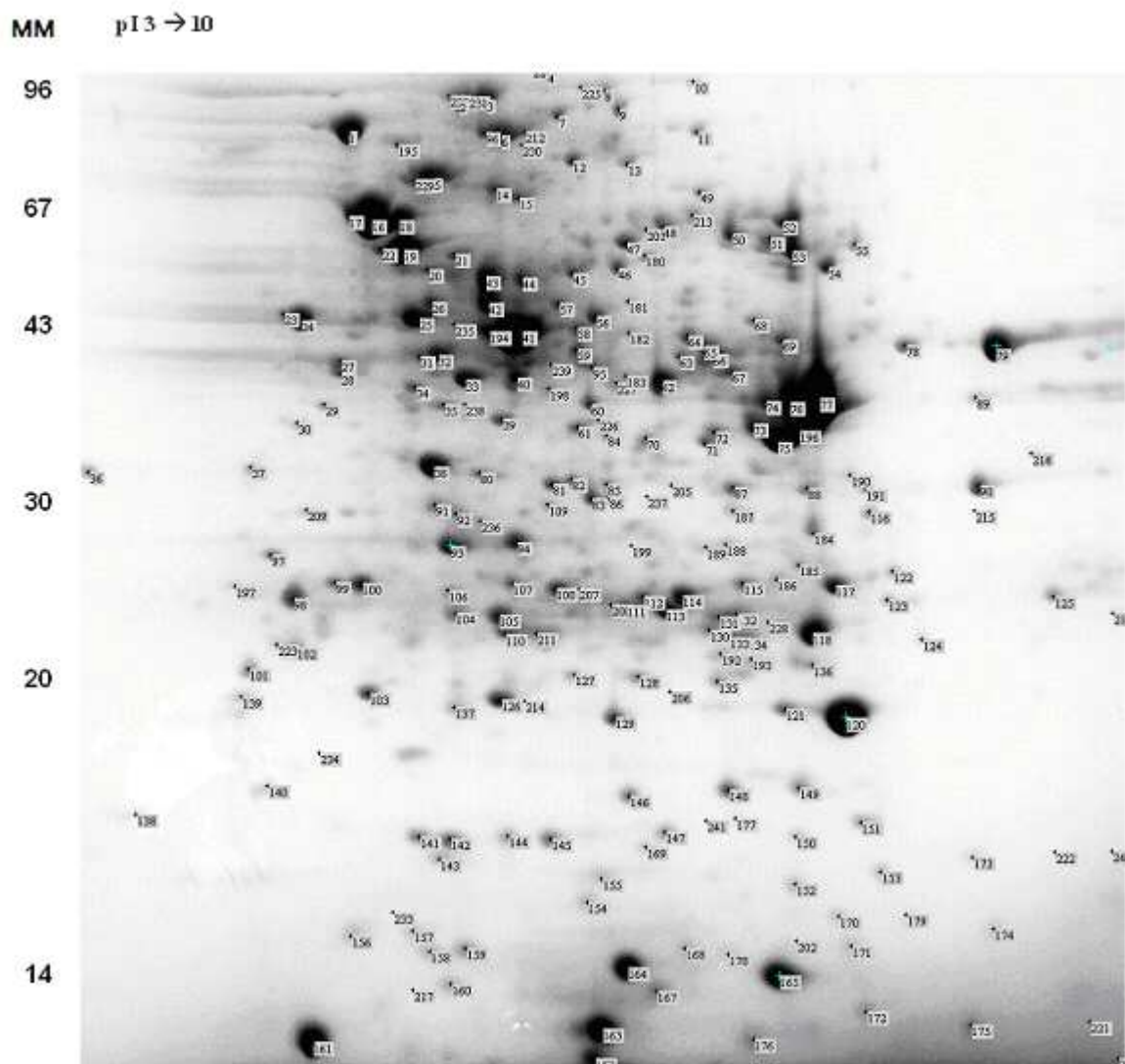
4.1.2 Categorias funcionais das proteínas identificadas no gel de referência de *H. seropedicae*

As proteínas anotadas do genoma de *H. seropedicae* (GENOPAR) foram classificadas em 19 categorias COG (*cluster of orthologous groups*) e proteínas pertencentes a 18 destas categorias foram identificadas no mapa bidimensional de referência (figura 5). A única categoria que esteve ausente foi a categoria V, que contém proteínas envolvidas em mecanismos de defesa, embora representadas no mapa teórico.

Estas categorias foram agrupadas em 4 classes principais: 1. proteínas envolvidas no metabolismo (C, E, G, H, F, I, Q); 2. armazenamento e processamento de informação (O, M, P, T, D, N, U); 3. processos celulares (J, K, L) e 4. proteínas não ou pouco caracterizadas (S, R).

Proteínas envolvidas no metabolismo representaram mais de 50% do total, sendo que proteínas envolvidas na produção e conversão de energia (C e G) e metabolismo e transporte de aminoácidos (E) representaram o maior percentual dentro desta classe. A segunda classe de proteínas mais abundantes foram proteínas envolvidas em processos celulares, sendo que dentro desta, proteínas

**FIGURA 4 - MAPA DE REFERÊNCIA DO PROTEOMA DAS PROTEÍNAS
CITOSÓLICAS DE *H. seropedicae***



Mapa de referência de proteínas citosólicas de *H. seropedicae* cultivado em meio NFbHP-malato contendo 20 mmol/L NH_4Cl a 30°C. As proteínas foram separadas em um gradiente de pH de 3 a 10 e o gel foi corado com Coomassie Blue coloidal. De 242 bandas protéicas detectadas, 207 foram identificadas.

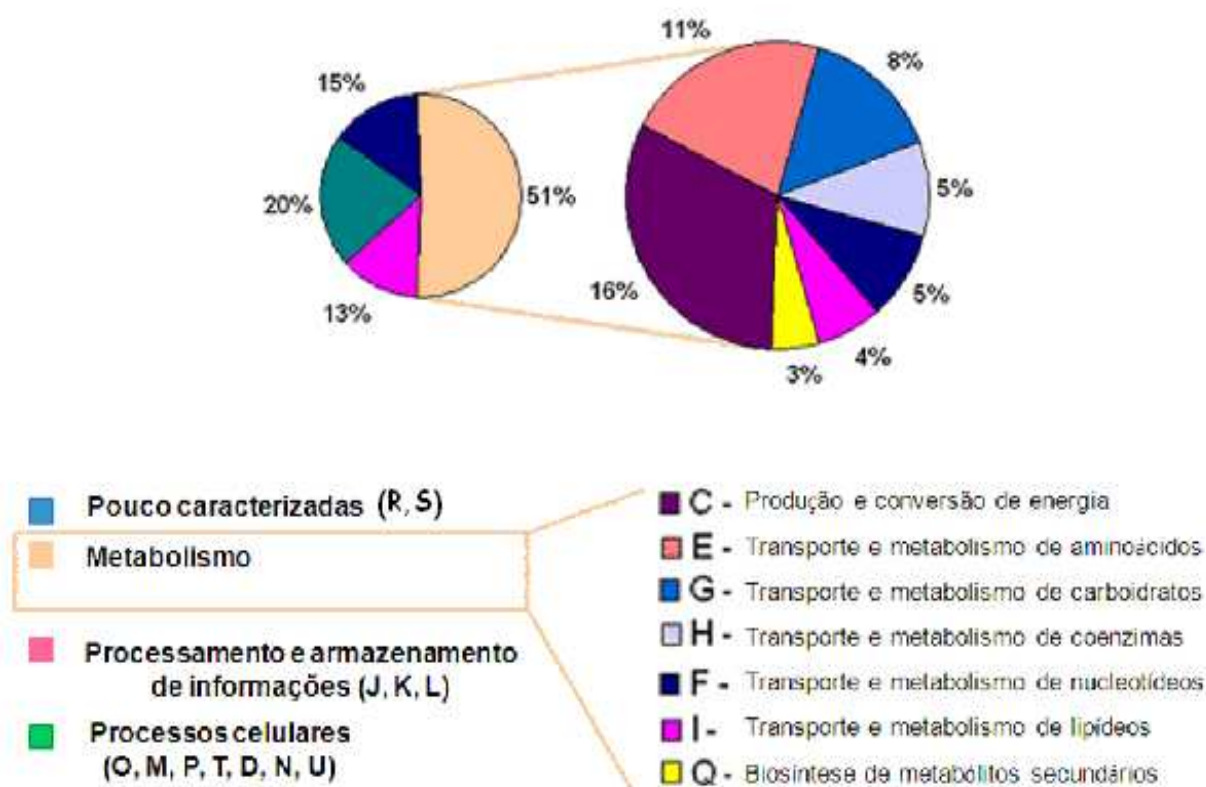
envolvidas em modificações pós-traducionais e proteínas com função de chaperonas (O) representaram 43% desta classe.

Dentre as proteínas que participam no processamento e armazenamento de informação, a categoria J, que contém as proteínas envolvidas em tradução, estrutura ribossomal e biogênese representou 75% das proteínas desta classe. Apenas 15% das proteínas identificadas pertenceram à classe das proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas.

A porcentagem de proteínas em cada categoria conforme a previsão decorrente do genoma anotado de *H. seropedicae* e a porcentagem destas identificadas dos géis 2D foi comparada e os resultados estão na figura 8.

Algumas categorias (C, E, J e O) estiveram super-representadas nos géis 2D, enquanto as categorias S, K e R estiveram sub-representadas. Embora aproximadamente 24% das proteínas do genoma citosólico de *H. seropedicae* estejam anotadas como hipotéticas ou conservadas hipotéticas (categoria S), apenas 8,7% das proteínas identificadas pertenceram a esta categoria. É possível que as proteínas do genoma do *H. seropedicae*, classificadas como hipotéticas, requeiram estímulos ambientais para sua expressão ou que sejam expressas em baixas concentrações ou, ainda, que não sejam expressas.

**FIGURA 5 - CLASSES DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO GEL DE
REFERÊNCIA DE *H. seropedicae***



R = Predição de função geral; S = Função desconhecida; J = Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; K = Transcrição; L = Replicação, recombinação e reparo; O = Modificação pós-traducional, chaperonas; M = Biogênese de parede/ membrana/ envelope celular; P = Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; T = Sinal de transdução; D = Controle do ciclo celular e divisão celular; N = Motilidade celular; U = Movimentação intracelular, secreção e transporte vesicular

Classes funcionais e categorias das proteínas identificadas no proteoma de *H. seropedicae*. Estão em destaque somente as proteínas da classe metabolismo.

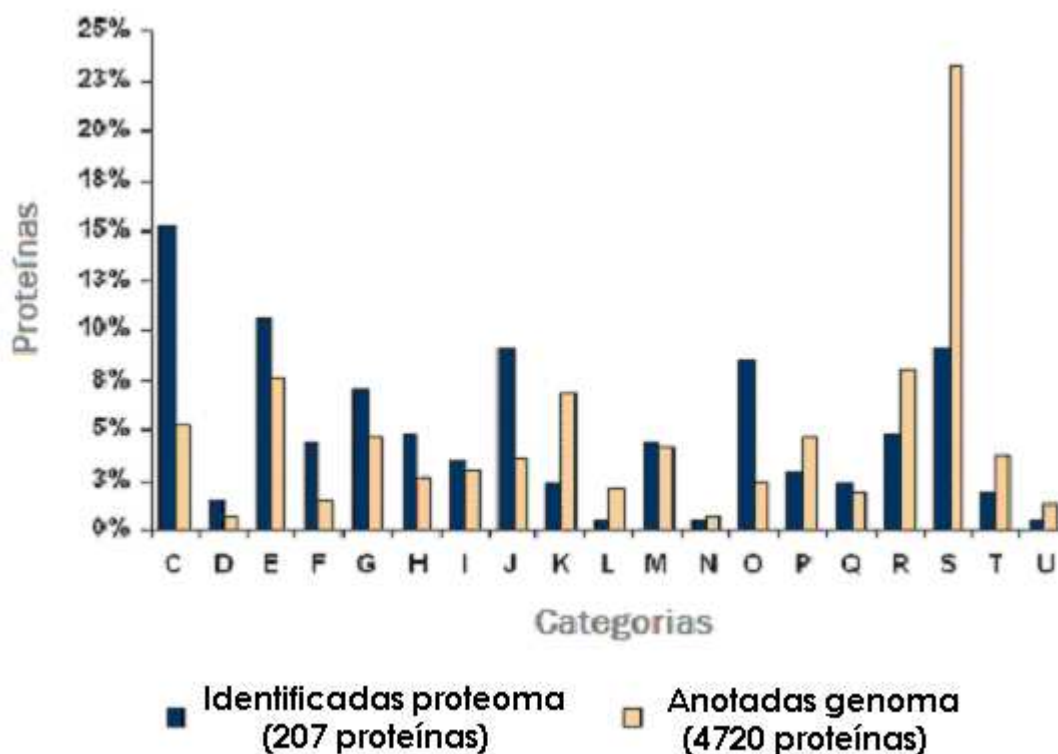
4.1.3 Proteínas altamente expressas

Para determinar a abundância relativa das proteínas identificadas, o gel sintético (figura 4) foi analisado quantitativamente e o volume percentual de cada mancha protéica foi calculado utilizando o programa Imagemaster Platinum v.5.0 (GE Healthcare). As 30 proteínas mais abundantes estão listadas na tabela 2. Entre estas, estiveram representadas proteínas ribossomais, enzimas envolvidas na síntese protéica, chaperonas moleculares e do metabolismo energético essencial como glicólise e ciclo do ácido tricarboxílico. Estas proteínas são altamente expressas constitutivamente na maioria dos procariotos (KARLIN & MRÁZEK, 2000)

A aril-álcool desidrogenase (banda 77) foi a enzima com níveis de expressão mais altos. Esta enzima participa de diversas vias metabólicas, sendo essencial no metabolismo de tirosina e fenilalanina. O fator de alongação de tradução Ef-Tu (banda 41) foi a segunda proteína mais altamente expressa. Esta participa na síntese protéica e é uma das proteínas com mais altos níveis de expressão nas células procarióticas (KARLIN & MRÁZEK, 2000; KUNZE et al., 2007).

Outra proteína com altos níveis de expressão foi a fasina. Esta classe de proteínas forma uma camada na superfície dos grânulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB), sendo necessárias para seu acúmulo. O acetil-CoA é usado como substrato na síntese do PHB por uma sequência de 3 reações catalisadas pela acetil-CoA acetiltransferase, 3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase e poli (3-hidroxibutirato) sintase (ANDERSON et al., 1990). As enzimas que catalisam os dois passos iniciais foram identificadas e a proteína regulatória PhbF de acúmulo de polibetahidroxibutirato foi também identificada.

FIGURA 6 - CATEGORIA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E PROTEÍNAS ANOTADAS NO GENOMA DE *H. seropedicae*



C = Conversão e produção de energia; D = Controle do ciclo celular e divisão celular; E = Metabolismo e transporte de aminoácido; F = Metabolismo e transporte de nucleotídeos; G = Metabolismo e transporte de carboidratos; H = Metabolismo e transporte de coenzimas; I = Metabolismo e transporte de lipídeos; J = Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; K = Transcrição; L = Replicação, recombinação e reparo; M = Biogênese de parede/ membrana/ envelope celular; N = Motilidade celular; O = Modificação pós-traducional, chaperonas; P = Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; Q = Biosíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo; R = Predição de função geral; S = Função desconhecida; T = Sinal de transdução; U = Movimentação intracelular, secreção e transporte vesicular

Porcentagem de proteínas nas categorias funcionais COG preditas pela anotação do genoma em comparação com as proteínas identificadas no proteoma de *H. seropedicae*.

Este polímero funciona como elemento de reserva de energia para as células. Os altos níveis de expressão da Fasina e a identificação da maior parte das enzimas envolvidas nesta via sugere o acúmulo de uma grande quantidade destes grânulos nas células de *H. seropedicae* nas condições analisadas.

4.1.4 Modificações pós-traducionais

Os dados da identificação de proteínas por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF indicaram que em *H. seropedicae*, assim como na maioria das bactérias, cerca de 20% das bandas proteicas identificadas sofreram modificações pós-traducionais. Evidências destas modificações foram obtidas em proteínas identificadas em diversas regiões dos géis bidimensionais. A maior parte das proteínas apresentou alteração em sua carga, o que sugere modificações como fosforilação (ANDERSON et al., 1990; HESKETH et al., 2002).

Vinte e duas proteínas foram identificadas como apresentando múltiplas isoformas (tabela 3). As proteínas enolase, FOF1-ATP sintase (subunidade beta), fator de alongação Tu e proteína ribossomal S1 da subunidade 30S, migraram com diferentes cargas durante a eletroforese. É possível que estas sejam modificadas por fosforilação, tendo em vista que estas proteínas são fosforiladas em *C. glutamicum* (KARLIN et al., 2003). Outras proteínas envolvidas no metabolismo energético também foram identificadas em dois ou três locais do gel.

**TABELA 2 - PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES NO PROTEOMA DE
REFERÊNCIA DE *H. seropedicae***

| PROTEÍNA | %V \pm SD | ID | ORF |
|--|-------------------------------|-----------|------------|
| Aril-álcool desidrogenase | 5,52 \pm 0,27 | 77 | 287.0401 |
| Fator de elongação de tradução TU (EF-Tu) | 4,28 \pm 0,26 | 41 | 249.0030 |
| Acetil-CoA acetiltransferase (acetoacetil-CoA tiolase) | 4,15 \pm 0,28 | 79 | 270.0667 |
| Fasina | 3,90 \pm 0,35 | 120 | 199.0025 |
| Chaperonina GroEL (HSP60 family) | 3,73 \pm 0,25 | 16 | 287.0016 |
| Proteína universal de estresse | 2,16 \pm 0,15 | 165 | 233.0318 |
| Acetoacetil-CoA redutase | 2,11 \pm 0,22 | 118 | 285.0252 |
| ATP sintase, tipo F0F1 subunidade beta | 1,95 \pm 0,13 | 19 | 283.0334 |
| Malato desidrogenase | 1,92 \pm 0,23 | 75 | 285.0028 |
| Chaperona DnaK | 1,91 \pm 0,09 | 1 | 260.0036 |
| Fator de elongação TS (EF-TS) | 1,80 \pm 0,08 | 62 | 268.0500 |
| Nucleosídeo-difosfato quinase | 1,51 \pm 0,08 | 164 | 212.0038 |
| Succinil-CoA sintetase, subunidade alfa | 1,45 \pm 0,12 | 90 | 259.0219 |
| Enolase (2-Fosfoglicerato desidratase) | 1,40 \pm 0,18 | 24 | 174.0063 |
| Aril-álcool desidrogenase | 1,36 \pm 0,23 | 76 | 287.0401 |
| Fator de elongação TS (EF-TS) | 1,36 \pm 0,12 | 38 | 231.0129 |
| Co-chaperonina GroES (HSP10) | 1,32 \pm 0,17 | 163 | 287.0013 |
| Proteína ribossomal S1 subunidade 30S | 1,13 \pm 0,11 | 5 | 244.0454 |
| Proteína universal de estresse | 1,10 \pm 0,05 | 93 | 276.0686 |

| PROTEÍNA | %V \pm SD | ID | ORF |
|---|-----------------|-----|----------|
| Peroxirredoxina | 1,05 \pm 0,03 | 126 | 142.0005 |
| Superóxido dismutase [Fe] | 1,00 \pm 0,12 | 129 | 256.0232 |
| Peptidil-prolil cis/trans isomerase | 0,99 \pm 0,06 | 18 | 180.0065 |
| Acil CoA:acetate/3-cetoácido CoA transferase, subunidade beta | 0,75 \pm 0,13 | 98 | 281.0054 |
| RNA polimerase (subunidade alfa) | 0,70 \pm 0,09 | 33 | 282.0078 |
| Pirofosfatase inorgânica | 0,65 \pm 0,12 | 103 | 251.0171 |
| Fator de elongação G1 (EF-G 1) | 0,59 \pm 0,10 | 3 | 194.0021 |
| 2-oxoglutarate desidrogenase, componente E3 | 0,59 \pm 0,06 | 53 | 212.0168 |
| Polirribonucleotídeo nucleotidil-transferase | 0,51 \pm 0,11 | 231 | 228.0122 |
| Dihidrolipoamide desidrogenase | 0,43 \pm 0,13 | 6 | 267.0068 |
| Protease Clp dependente de ATP | 0,39 \pm 0,03 | 4 | 269.0310 |

%V \pm SD = Média %V(volume de 1 banda protéica / Σ de todas as bandas x 100) de quatro géis 2D \pm SD (desvio padrão); **ID** = identidade da banda na figura 6; **ORF** = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

Algumas proteínas migraram com diferentes massas moleculares aparentes. Uma superóxido dismutase contendo ferro foi identificada em duas bandas protéicas, uma delas apresentando massa molecular duas vezes superior à massa teórica (20 e 40 kDa respectivamente), sugerindo a formação de um homodímero. Outro exemplo de possível homodímero foi a NADPH: quinona oxidoredutase, onde uma das isoformas foi identificada com uma massa duas vezes superior à massa teórica prevista.

Evidências para fosforilação e adenililação foram obtidas nos espectros de massa da GroEL e glutamina sintetase, respectivamente. A chaperonina GroEL esteve presente em duas posições com a mesma massa e valores de pI de 5,14 e 5,0, sendo a segunda isoforma 15 vezes mais abundante. A GroEL de *E. coli* é fosforilada em resposta ao choque térmico (NATERA et al., 2000), mas em condições normais, a forma fosforilada está presente apenas em pequenas quantidades. A presença de múltiplas isoformas desta chaperonina foi relatada em diversos estudos proteômicos (BENDT et al., 2003; NATERA et al., 2000; WASINGER et al., 2000; BUTTNER et al., 2001). Evidências de modificação por fosforilação foram obtidas na impressão digital de peptídeos da GroEL. Utilizando a base de dados dtPTM (<http://dbptm.mbc.nctu.edu.tw/>) foram encontrados peptídeos com sítios prováveis de fosforilação. Dois destes peptídeos estiveram presentes apenas na forma mais acídica com um aumento de massa de 80 Da, o que é consistente com o incremento ocasionado pela fosforilação.

**TABELA 3 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM DIVERSOS LOCAIS DO GEL-2D
DE REFERÊNCIA DE *H. seropedicae***

| PROTEÍNA | ORF | pI exp. | MM exp. | pI teor. | MM teor. |
|--|----------|------------|------------|-------------|-------------|
| Acetil-CoA acetiltransferase | 270.0667 | 8,14 | 39 | 7,64 | 40,4 |
| | | 8,60 | 39 | 7,64 | 40,4 |
| Álcool desidrogenase | 287.0401 | 7,31 | 36 | 6,50 | 36,1 |
| | | 7,50 | 34 | 6,50 | 36,1 |
| | | 7,66 | 36 | 6,50 | 36,1 |
| ATP sintase, tipo F0F1 subunidade beta | 283.0334 | 5,34 | 50 | 5,17 | 50,3 |
| | | 5,21 | 51 | 5,17 | 50,3 |
| Chaperonina GroEL | 287.0016 | 5,14 | 55 | 5,13 | 56,8 |
| | | 5,00 | 55 | 5,13 | 56,8 |
| Enolase | 174.0063 | 4,80 | 43 | 4,83 | 45,9 |
| | | 4,90 | 42 | 4,83 | 45,9 |
| Frutose-1,6-bifosfato aldolase | 259.0332 | 6,70 | 37 | 5,87 | 38,4 |
| | | 6,52 | 37 | 5,87 | 38,4 |
| Glutamina sintetase | 254.0347 | 5,85 | 59 | 5,48 | 52,2 |
| | | 5,97 | 58 | 5,48 | 52,2 |
| Malato desidrogenase | 285.0028 | 6,4 | 37 | 6,25 | 35,3 |
| | | 6,3 | 33 | 6,25 | 35,3 |

| PROTEÍNA | ORF | pl exp. | MM exp. | pl teo. | MM teo. |
|---|----------|------------|------------|------------|------------|
| | | 5,48 | 39 | 5,68 | 36,3 |
| | | 5,60 | 39 | 5,68 | 36,3 |
| NADPH:quinona oxidorreductase | 286.1638 | 6,15 | 37 | 5,68 | 36,3 |
| | | 6,38 | 22 | 5,68 | 36,3 |
| | | 6,02 | 67 | 5,68 | 36,3 |
| | | 5,19 | 80 | 5,40 | 76,2 |
| Poliribonucleotídeo nucleotíldiltransferase | 228.0122 | 5,27 | 78 | 5,40 | 76,2 |
| | | 5,34 | 80 | 5,40 | 76,2 |
| | | 6,52 | 27 | 5,88 | 24,7 |
| Piridoxamina 5`-fosfato oxidase | 259.0441 | 6,45 | 27 | 5,88 | 24,7 |
| | | 5,68 | 30 | 5,69 | 31,1 |
| Proteína universal de estresse | 276.0686 | 5,65 | 29 | 5,69 | 31,1 |
| | | 5,40 | 58 | 5,30 | 63,8 |
| 30s subunidade ribossomal S1 | 244.0454 | 5,47 | 58 | 5,30 | 63,8 |
| | | 5,78 | 40 | 5,82 | 21,38 |
| | | 7,58 | 31 | 7,66 | 30,5 |
| Succinil-CoA sintetase, cadeia alfa | 259.0219 | 7,93 | 31 | 7,66 | 30,5 |
| | | 8,50 | 31 | 7,66 | 30,5 |

pl e MM exp. = pl e MM experimentais calculados pela migração no gel 2D; **pl e MM teo.** = pl e MM teórico calculado pelo programa ProteinProspector; **ORF** = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

Cada uma das 12 subunidades da glutamina sintetase (GS) de *E. coli* e de diversos outros microrganismos pode ser modificada por adenililação de um resíduo conservado de tirosina (FINK et al., 1999; ANDERSON et al., 1990). A GS de *H. seropedicae* apresentou duas bandas proteicas e os dados de espectrometria MALDI-TOF revelaram que o peptídeo tríptico 398-408 da forma mais acídica apresentou um aumento em sua massa molecular de 329 Da, sugerindo que em *H. seropedicae* adenililação da GS ocorre no resíduo Tyr⁴⁰⁰ (figura 7). A forma adenililada foi mais abundante (representando 57% do total de GS) que a forma não modificada, o que é consistente com a regulação dependente de NH₄⁺ desta enzima, presente em maiores concentrações na forma modificada quando há excesso de amônio.

4.1.5 Vias metabólicas potencialmente ativas

Das 207 proteínas identificadas, foi possível assinalar número EC para 167 destas. Uma busca na “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG) utilizando estes números revelou as possíveis vias metabólicas que estão operacionais em *H. seropedicae* cultivado em meio NFbHP contendo 20 mol/L de cloreto de amônio.

Entre estas, enzimas pertencentes a vias de manutenção de funções celulares (*housekeeping*) como metabolismo energético, metabolismo de nucleotídeos e aminoácidos estiveram fortemente representadas. As vias envolvidas no metabolismo de purinas, glicólise/gluconeogênese e metabolismo de piruvato foram representadas por mais de 10 enzimas, o que permite concluir que as

**FIGURA 7 - MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA GLUTAMINA SINTETASE
(GS) DE *H. seropedicae***



Espectro obtido das bandas protéicas 15 (espectro 1) e 14 (espectro 2) do gel de referência de proteínas celulares de *H. seropedicae*. 1) espectro mostrando o mesmo pico adicionado de um grupamento AMP na forma modificada da GS.; 2) espectro mostrando o pico de massa 1684.584, correspondente ao peptídeo DLYHLPPEEDK da GS não modificada

vias catabólicas principais (glicólise, metabolismo do piruvato, via das pentoses fosfato e ciclo do ácido cítrico) são funcionais sob as condições analisadas.

4.2 MAPA BIDIMENSIONAL REPRESENTATIVO DAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR *H. seropedicae*

Um gel de referência de proteínas secretadas por *H. seropedicae*, foi construído utilizando-se 4 géis obtidos de amostras diferentes. No gel referencial foram adicionadas proteínas presentes em pelo menos 3 dos 4 géis. A figura 10 mostra o gel representativo desta condição. Foram detectadas 159 proteínas e destas, 65 foram identificadas com uma cobertura média de 30,8%. Cada proteína foi removida de pelo menos dois géis para análise por espectrometria de massas pelo padrão de massa dos peptídeos trípticos (PMF). A identificação foi feita utilizando o programa ProteinProspector v2.0 e o banco de dados completo de proteínas provenientes do genoma deste organismo (GENOPAR). A lista completa das proteínas identificadas está apresentada na tabela 4 e os dados resultantes da melhor identificação estão no anexo I.

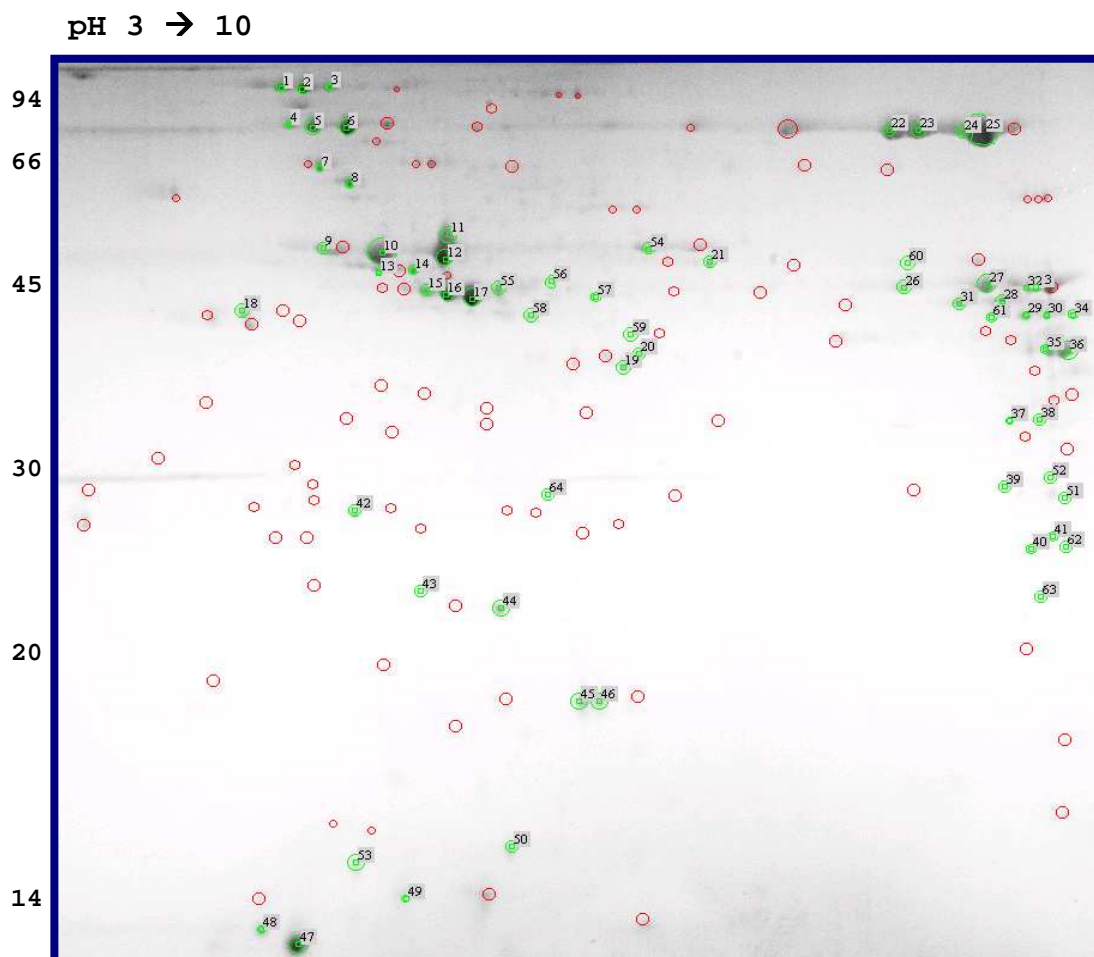
Um problema no estudo do secretoma são as proteínas celulares que muitas vezes são liberadas devido à lise celular espontânea. Diversas proteínas citoplasmáticas tem sido identificadas em estudos de secretoma e a lise celular foi considerada responsável pela presença destas na fração extracelular (KIM et al., 2005; KAZEMI-POUR et al., 2004).

Para verificar a contribuição relativa da lise celular e da secreção no padrão protéico, o perfil do proteoma celular e do secretoma foi comparado utilizando como base as 20 proteínas mais abundantes do proteoma celular (CHAVES et al., 2007).

Como pode ser observado na figura 9, o perfil de proteínas celulares e secretadas é substancialmente diferente. Das proteínas mais abundantes na célula, apenas 4 foram observadas no secretoma (EF-Tu, GroEL, fator de elongação GTPase e superóxido dismutase). É possível que estas 4 proteínas sejam realmente secretadas, tendo em vista que 3 delas (superóxido dismutase, GroEL e fator de elongação GTPase) também foram identificadas como secretadas por outros microrganismos (KAZEMI-POUR et al., 2004, ANTELMANN et al., 2001; VANET & LAVIGNE, 1998, MATZKE, 2003). Outras proteínas com abundância relativa superior a estas (aril-álcool desidrogenase, acetil-CoA acetiltransferase e fasina) não foram observadas indicando que se ocorreu lise celular, não foi significativa.

O acúmulo de proteínas extracelulares no meio de cultura é dependente da fase de crescimento. Em densidades óticas abaixo de 0,8 não foi possível recuperar quantidade de proteína suficiente para realizar géis bidimensionais, mesmo utilizando grandes volumes de cultura (volumes quatro vezes superiores aos utilizados para $D.O_{600} = 1,0$). Tais dados sugerem o requerimento de uma certa densidade celular até que proteínas translocadas sejam acumuladas em quantidade suficiente que permita sua detecção. Em culturas crescidas até uma densidade ótica superior a 1,4, a contaminação por lise celular foi muito significativa, portanto estes géis não foram utilizados.

FIGURA 8 – GEL DE REFERÊNCIA DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *H. seropedicae*



Gel 2D de proteínas secretadas pela estirpe Smr1 cultivada em meio NFbHP-Malato na presença de 20 mmol/L de NH_4Cl . A primeira dimensão foi realizada em tiras IPG faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 12,5%. O gel foi corado utilizando Coomassie coloidal. O gel foi realizado utilizando 100 μg de proteína. As proteínas destacadas em verde foram identificadas.

**TABELA 4 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO GEL DE REFERÊNCIA DE
PROTEÍNAS SECRETADAS PELA ESTIRPE SMR1 DE *H. seropedicae***

| ID | pI exp. | MM exp. | pI teor. | MM teor. | %V | ORF | PROTEÍNA |
|----|------------|------------|-------------|-------------|------|----------|---|
| 1 | 7,7 | 82 | 5,0 | 79 | 0,30 | 227.0043 | Proteína 1 associada ao gancho do flagelo |
| 10 | 5,3 | 44 | 5,5 | 37 | 6,24 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 11 | 5,7 | 46 | 5,5 | 37 | 2,07 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 12 | 5,6 | 44 | 5,5 | 37 | 2,51 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 13 | 5,3 | 42 | 5,5 | 37 | 0,14 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 14 | 5,5 | 42 | 5,4 | 43 | 0,37 | 249.0030 | Fator de elongação EF-Tu |
| 15 | 5,5 | 41 | 5,6 | 36 | 0,40 | 286.1638 | NADPH:quinona oxidoredutase |
| 16 | 5,7 | 40 | 5,6 | 36 | 1,42 | 286.1638 | NADPH:quinona oxidoredutase |
| 17 | 5,8 | 40 | 5,6 | 36 | 3,22 | 286.1638 | NADPH:quinona oxidoredutase |
| 18 | 4,4 | 39 | 4,8 | 40 | 1,20 | 227.0027 | Flagelina, N-terminal |
| 19 | 6,7 | 35 | 6,1 | 37 | 1,17 | 269.0717 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 20 | 4,9 | 76 | 5,0 | 79 | 0,71 | 227.0043 | Proteína 1 associada ao gancho do flagelo |
| 20 | 6,8 | 36 | 6,9 | 35 | 0,87 | 167.0031 | Proteína lipase transmembrana |
| 21 | 7,3 | 43 | 6,8 | 44 | 0,54 | 265.0054 | Serina hidroximetiltransferase |
| 22 | 8,4 | 65 | 8,3 | 68 | 0,32 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 23 | 8,6 | 65 | 8,3 | 68 | 0,42 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 24 | 8,9 | 65 | 8,3 | 68 | 1,35 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 25 | 9,0 | 64 | 8,3 | 68 | 9,04 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |

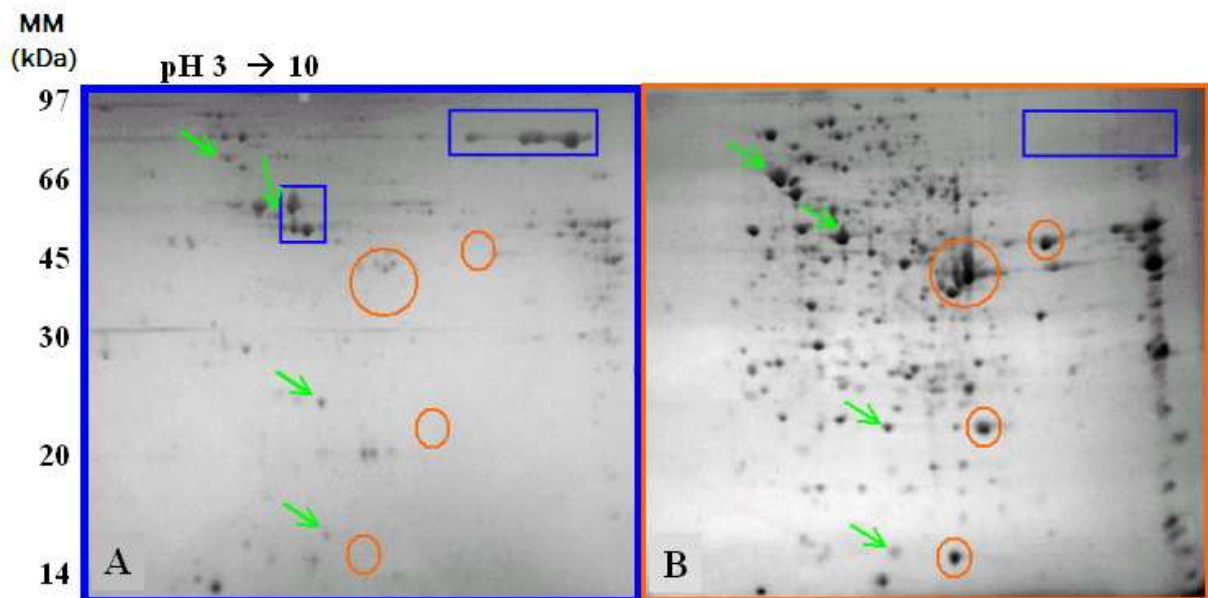
| ID | pl exp. | MM exp. | pl teor. | MM teor. | %V | ORF | PROTEÍNA |
|----|------------|------------|-------------|-------------|------|----------|--|
| 27 | 9,0 | 41 | 8,7 | 29 | 1,95 | 218.0221 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 28 | 9,0 | 40 | 8,8 | 43 | 1,22 | 250.0431 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 29 | 9,3 | 40 | 8,7 | 40 | 0,15 | 251.0297 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 30 | 5,2 | 77 | 5,0 | 79 | 0,10 | 227.0043 | Proteína associada ao gancho 1 |
| 30 | 9,3 | 39 | 9,0 | 40 | 0,16 | 282.0421 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 31 | 8,9 | 40 | 8,8 | 43 | 0,71 | 250.0431 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 32 | 9,3 | 42 | 8,8 | 39 | 0,10 | 287.0725 | Proteína regulatória tipo Ara-C |
| 33 | 9,4 | 43 | 9,1 | 32 | 0,33 | 238.0006 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 34 | 9,6 | 38 | 9,4 | 39 | 0,25 | 193.0074 | Porina |
| 35 | 9,4 | 38 | 9,2 | 41 | 0,54 | 284.1361 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 36 | 9,6 | 40 | 8,8 | 34 | 3,23 | 283.1328 | Amidohidrolase-2 |
| 37 | 9,2 | 33 | 9,1 | 29 | 0,13 | 177.0087 | Transportador ABC – componente periplasmático |
| 38 | 9,4 | 33 | 9,1 | 29 | 0,64 | 177.0087 | Transportador ABC – componente periplasmático |
| 45 | 6,7 | 19 | 5,9 | 18 | 2,24 | 279.0505 | Hipotética conservada |
| 46 | 6,9 | 19 | 5,9 | 18 | 1,08 | 279.0505 | Hipotética conservada |
| 48 | 4,8 | 13 | 4,9 | 12 | 0,12 | 269.0706 | Flagelina |

| ID | pl exp. | MM exp. | pl teor. | MM teor. | %V | ORF | PROTEÍNA |
|----|------------|------------|-------------|-------------|------|----------|--|
| 49 | 5,4 | 14 | 5,1 | 13 | 0,09 | 286.1627 | Hipotética |
| 5 | 4,9 | 66 | 6,1 | 37 | 1,68 | 269.0717 | Proteína associada ao gancho 2 |
| 50 | 6,0 | 15 | 5,7 | 15 | 0,41 | 212.0038 | Nucleosídeo difosfato quinase |
| 51 | 9,4 | 27 | 9,2 | 28 | 0,50 | 214.0155 | Transportador ABC de aminoácidos |
| 52 | 9,4 | 29 | 9,29 | 28 | 0,45 | 287.0064 | Transportador ABC de íons metálicos |
| 53 | 5,4 | 15 | 5,1 | 13 | 1,15 | 286.1627 | Hipotética |
| 54 | 7,0 | 43 | 6,8 | 44 | 0,66 | 265.0054 | Serina hidroximetiltransferase |
| 55 | 6,0 | 41 | 5,6 | 36 | 0,81 | 286.1638 | NADPH:quinona oxidoreductase |
| 56 | 6,3 | 41 | 6,3 | 41 | 0,24 | 263.0522 | DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase |
| 57 | 6,6 | 40 | 6,2 | 39 | 0,33 | 254.0148 | NADH:flavina oxidoreductase |
| 58 | 6,2 | 39 | 6,0 | 36 | 0,67 | 268.0500 | Ceto-ácido redutoisomerase oxidoreductase |
| 59 | 6,8 | 37 | 5,4 | 32 | 0,50 | 241.0093 | Transportador ABC de açúcares |
| 6 | 5,1 | 65 | 6,1 | 37 | 1,88 | 269.0717 | Proteína associada ao gancho 2 |
| 60 | 8,5 | 43 | 8,9 | 40 | 0,51 | 272.0807 | ATPase do sistema tipo II |
| 61 | 9,0 | 39 | 8,7 | 40 | 0,34 | 251.0297 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 62 | 9,4 | 25 | 9,3 | 23 | 0,54 | 284.0598 | Transportador ABC envolvido em resistência a solventes orgânicos |
| 63 | 9,3 | 23 | 9,2 | 22 | 0,41 | 271.0244 | Proteína de membrana externa |
| 64 | 6,3 | 27 | 6,0 | 24 | 0,45 | 281.0058 | Acil CoA:acetato/3-cetoácido CoA transferase |
| 65 | 7,1 | 27 | 6,8 | 23 | 0,53 | 256.0172 | Adenilato quinase |
| 7 | 5,0 | 55 | 5,1 | 56 | 0,11 | 287.0016 | Chaperonina GroEL |

| ID | pl exp. | MM exp. | pl teor. | MM teor. | %V | ORF | PROTEÍNA |
|----|------------|------------|-------------|-------------|------|----------|-------------------------------------|
| 8 | 5,2 | 53 | 5,1 | 49 | 0,54 | 180.0065 | Peptidil-prolil cis/trans isomerase |
| 9 | 4,9 | 44 | 5,5 | 37 | 0,53 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |

ID = identidade da banda na figura 8; **pl exp.** = pl experimental calculado pela migração no gel 2D; **MM exp.** = MM experimental calculada pela migração no gel 2D; **pl teor.** = pl teórico calculado pelo programa ProteinProspector; **MM teor.** = MM teórica calculada pelo programa ProteinProspector; **ORF** = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

FIGURA 9 – ANÁLISE COMPARATIVA DE PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES IDENTIFICADAS NO PROTEOMA CELULAR E SECRETOMA



Análise comparativa das proteínas mais abundantes presentes no secretoma (A) e proteoma celular (B). As setas indicam proteínas que foram identificadas em ambos extratos. Os círculos indicam as proteínas mais abundantes que foram identificadas exclusivamente no proteoma celular e os retângulos aquelas mais abundantes do secretoma e que estão ausentes no proteoma celular.

4.2.1 Análises *in silico* de prováveis mecanismos envolvidos na secreção de proteínas identificadas de *H. seropedicae*

Os programas SignalP 3.0 e TatP 1.0 foram utilizados para identificar possíveis sequências de sinalização de exportação de proteínas identificadas no secretoma de *H. seropedicae*. Os programas identificaram a presença de peptídeo sinal Sec-dependente e TAT-dependente. As proteínas que não apresentaram nenhuma sequência sinalizadora foram então analisadas utilizando o programa SecretomeP 2.0 para permitir a identificação de proteínas secretadas por mecanismos não clássicos.

4.2.2 Proteínas com peptídeo sinal Sec-dependente

A maior parte das proteínas que são completamente transportadas através da membrana plasmática são sintetizadas com um sinal amino-terminal que é removido por peptidases de sinal (Spases) durante ou após a translocação (ANTELMANN et al., 2001; TJALSMA et al., 2000).

O programa SignalP 3.0 foi usado para determinar a presença de peptídeo sinal. Do total de proteínas identificadas, 14 apresentaram um provável peptídeo sinal (escore maior ou igual a 0,5) (tabela 5) para transporte Sec-dependente através da membrana plasmática.

Dentre estas proteínas foram identificadas componentes do sistema de transporte ABC, duas proteínas de membrana externa, uma proteína transmembrana e componentes do flagelo. Proteínas secretadas por esta via podem permanecer no espaço periplasmático (como por exemplos os transportadores ABC)

ou ainda serem transportadas até o exterior da célula. O transporte através da membrana externa pode ser realizado pelos sistemas de transporte tipo II ou IV.

4.2.3 Proteínas com peptídeo sinal Tat-dependente

O programa TatP 1.0 foi utilizado para pesquisar a presença de motivos Tat nas proteínas com peptídeo sinal. Duas delas são candidatas a secreção independente do sistema Sec (tabela 6).

A proteína amidohidrolase 2 possui um motivo Tat iniciando na posição 6. Amidohidrolases possuem um centro metálico em sua estrutura e ligam cofatores no citoplasma. Portanto, a manutenção da estrutura enovelada é importante para a atividade da proteína no meio extracelular (BERKS et al., 2000). Tendo em vista que a via de secreção Tat-dependente exporta proteínas em sua conformação nativa, esta é a rota mais provável para secreção da amidohidrolase 2.

Além de proteínas que ligam cofatores, outras proteínas que normalmente contém peptídeo sinal Tat-dependente são proteínas de membrana, lipoproteínas e proteínas envolvidas em ligação e transporte (SCHAERLAEKENS et al., 2004). Uma proteína pertencente à esta última classe, o transportador ABC de íons metálicos (HS287.0064), também apresentou motivo Tat-dependente.

4.2.4 Proteínas secretadas por mecanismos não clássicos

A secreção de proteínas por bactérias gram-negativas é normalmente mediada pelo reconhecimento de um peptídeo sinal N-terminal que funciona como uma “etiqueta” de direcionamento para o aparato de secreção (TJALSMA et al., 2000).

TABELA 5 – PROTEÍNAS COM PEPTÍDEO SINAL SEC-DEPENDENTE

| ID | ORF | PROTEÍNA | P.C. | Prob.C. |
|--------------|------------|--|-------------|----------------|
| 1-3 | 227.0043 | Proteína 1 associada ao gancho do flagelo | 21 | 0,6 |
| 20 | 167.0031 | Proteína lipase transmembrana | 59 | 0,6 |
| 28 | 250.0431 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático | 24 | 1 |
| 29 | 251.0297 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático | 25 | 1 |
| 30 | 282.0421 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático | 24 | 1 |
| 34 | 193.0074 | Porina | 20 | 1 |
| 35 | 284.1361 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático | 25 | 1 |
| 39 | 215.0122 | Transportador ABC de íons metálicos | 23 | 1 |
| 41 | 283.0231 | Peptídeo sinal de intercâmbio tiol:dissulfídeo | 26 | 0,9 |
| 9, 47, 48 | 269.0706 | Flagelina | 19 | 0,6 |
| 51 | 214.0155 | Transportador ABC de aminoácidos | 26 | 1 |
| 56 | 263.0522 | DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase | 51 | 0,5 |
| 62 | 284.0598 | Transportador ABC envolvido em resistência a solventes orgânicos | 26 | 1 |
| 63 | 271.0244 | Proteína de membrana externa | 24 | 1 |

ID = identidade da banda na figura 8; **ORF** = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org).; **P.C.** = posição de clivagem calculada pelo programa SignalP v.3.0; **Prob. C.** = probabilidade de clivagem calculada pelo programa SignalP v.3.0. Vores de Prob. C acima de 0,5 são significativos.

TABELA 6 – PROTEÍNAS COM PEPTÍDEO SINAL TAT-DEPENDENTE

| ID | ORF | PROTEÍNA | SEQUENCIA DO PEPTÍDEO |
|-----------|------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 36 | 283.1328 | Amidohidrolase 2 | MQDLPS RR DFLRRSGQLALSLG |
| 52 | 287.0064 | Transportador ABC de íons metálicos | MK RR QLIQFIAGLGLAAGLVSA |

ID = identidade da banda na figura 8; **ORF** = identidade da ORF no genoma de *H. seropedicae* (www.genopar.org/genome); **SEQUÊNCIA DO PEPTÍDEO** = Peptídeo sinal com o motivo de dupla arginina destacado. Estão mostrados os 22 aminoácidos da região N-terminal.

Entretanto diversas proteínas bacterianas foram identificadas como secretadas sem possuírem nenhum sinal aparente ou motivo conservado. Embora a presença destas proteínas no meio extracelular tenha sido atribuída à lise celular por diversos autores, estas observações são recorrentes em grupos de pesquisa trabalhando em condições experimentais controladas. Face a estas observações, Bendsten e colaboradores (2005) denominaram este tipo de secreção como “não-clássica” e desenvolveram um programa (SecretomeP 2.0) capaz de identificar estas proteínas com base em propriedades como composição de aminoácidos, estrutura secundária e regiões de desordem (BENDSTEN et al., 2005).

O programa SecretomeP 2.0 (BENDSTEN et al., 2005) foi utilizado para identificar proteínas candidatas a este mecanismo de secreção. Desta busca foram excluídas proteínas portadoras de peptídeo sinal. Dentre as proteínas identificadas no secretoma de *H. seropedicae*, doze proteínas foram encontradas como candidatas a secreção pelos mecanismos não clássicos (tabela 7). Dentre estas está a superóxido dismutase (SOD), que já foi identificada no secretoma de diversos organismos (HARTH & HORWITZ, 1999; SCHAUMBURG et al., 2004; ANTELMANN et al., 2001). Esta proteína foi identificada no proteoma celular de *H. seropedicae* (CHAVES et al., 2007), entretanto, sua abundância relativa no secretoma (2,3%) foi superior à encontrada no proteoma (0,18%), indicando que sua concentração é maior no meio extracelular.

Harth e Horwitz (1999) mostraram que esta proteína está presente no citoplasma da bactéria patogênica *M. tuberculosis* e na não-patogênica *M. smegmatis*, mas somente o patógeno é capaz de secretá-la. Os mesmos autores mostraram que a SOD recombinante de *M. tuberculosis* é capaz de

transcomplementar uma *Escherichia coli* deficiente em SOD. Por outro lado, *E. coli* não é capaz de exportá-la, concluindo que a secreção desta proteína requer uma maquinaria específica presente nas micobactérias. O fato desta proteína ser também secretada por *H. seropedicae* sugere que a secreção desta enzima é feita por um mecanismo compartilhado também por outros microorganismos.

A secreção desta enzima por *H. seropedicae* pode ser importante para proteger a bactéria do dano oxidativo com o qual muitas plantas reagem às infecções bacterianas. Já foi demonstrado que SOD diminui os efeitos tóxicos causados por espécies reativas de oxigênio produzidas pelas plantas (GOURION et al., 2006). Adicionalmente, Kim e colaboradores (2000) demonstraram que mutantes SOD-deficientes de *Pseudomonas putida* apresentaram colonização prejudicada das raízes de plantas e diminuição da reprodução bacteriana *in planta*.

Também estiveram presentes nesta classe de proteínas, diversos componentes estruturais do flagelo, transportadores ABC e proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas.

4.3 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

Diversas proteínas foram encontradas em mais do que uma região do gel, o que sugere que apresentam algum tipo de modificação pós-traducional (tabela 8).

A proteína hipotética conservada HS279.0505 foi uma das proteínas mais abundantes encontrada no secretoma de *H. seropedicae*. Sua localização celular prevista pelo programa PSORTb indicou igual probabilidade de localização citoplasmática ou extracelular.

TABELA 7 – PROTEÍNAS SECRETADAS POR MECANISMOS NÃO CLÁSSICOS

| ID | ORF | PROTEÍNA | NN escore |
|-----------|------------|--|----------------------|
| 26, 27 | 218.0221 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático | 0,92 |
| 18 | 227.0027 | Flagelina, N-terminal | 0,96 |
| 33 | 238.0006 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático | 0,95 |
| 42 | 238.0267 | Hipotética | 0,95 |
| 57 | 254.0148 | NADH:flavina oxidoredutase | 0,53 |
| 22-25 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo | 0,95 |
| 44 | 256.0232 | Superóxido dismutase | 0,94 |
| 9-13 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural | 0,96 |
| 4-6, 19 | 269.0717 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo | 0,94 |
| 45, 46 | 279.0505 | Hipotética conservada | 0,87 |

ID = identidade da banda na figura 10; **ORF** = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org).; **NN score** = Escore fornecido pelo programa SecretomeP. Valores acima de 0,5 indicam secreção pelo mecanismo não-clássico.

Esta proteína foi encontrada no gel de proteínas secretadas em 2 pontos com exatamente a mesma massa e pequena diferença no ponto isoelétrico (0,1 unidade de pH). É possível que ela seja modificada por fosforilação, tendo em vista que na forma mais ácida (45) foi detectado um pico com massa 1779,74 Da, que está ausente na forma mais básica. Na forma mais básica foi detectado um pico de massa 1699,922, que corresponde ao peptídeo VADLASPLLQNSSSGK. A diferença entre os dois picos (79 Da), sugere a fosforilação de um dos diversos resíduos de serina presentes nesse peptídeo.

A identificação de proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas no secretoma confirma a expressão destas proteínas e também sugere uma função extracitoplasmática. Adicionalmente, quando a proteína é identificada em mais de um ponto, há grande possibilidade da sua função ser regulada por modificação ou modificações pós-traducionais.

A NADPH:quinona oxidoredutase (Qor) esteve presente como 4 isoformas (bandas 15, 16, 17 e 55) com diferentes pontos isoelétricos e praticamente a mesma massa, sendo que todas as formas migraram em uma massa experimental entre 4 e 5 kDa superior à massa teórica. Duas destas isoformas (bandas 16 e 17) estiveram entre as proteínas mais abundantes do secretoma (tabela 4). Esta proteína também foi identificada em diferentes bandas no proteoma celular (CHAVES et al., 2007), o que indica extenso processamento pós-traducional. Esta proteína não possui peptídeo sinal e diversos métodos de previsão de localização celular prevêm localização exclusivamente citoplasmática. Uma análise detalhada dos espectros de cada isoforma, apesar de alguns peptídeos terem sido detectados exclusivamente em uma ou outra forma, não revelou modificações pós-traducionais conhecidas. Até

o momento não foram encontrados relatos da secreção desta proteína em outros microrganismos.

Interessantemente, o gene *qor* está localizado a jusante do codificador da proteína hipotética HS286.1627, que também foi identificada no proteoma celular e secretoma de *H. seropedicae*, entretanto com uma abundância relativa 15 vezes superior no último. Análise da sequência desta proteína pelo programa PSORTb indicou igual probabilidade de localização citoplasmática ou extracelular.

4.3.1 Transportadores ABC

Seis proteínas periplasmáticas pertencentes à família de transportadores ABC foram identificadas em dois locais do gel. Em todos os casos, houve diferença no ponto isoelétrico, mas praticamente nenhuma alteração na massa.

Já foram relatadas modificações por clivagem da metionina inicial e acetilação N-terminal (HESKETH et al., 2002), fosforilação, glicosilação e ubiquitinação (NIIMI et al., 2005). O transportador de nitrato NrtA de *Phormidium lamosum* além da regulação por fosforilação contém também diversos resíduos com metionina sulfóxido, que são responsáveis pelas diversas isoformas com diferentes pontos isoelétricos (NAGORE et al., 2006).

Mudanças no ponto isoelétrico podem ser ocasionadas por modificações covalentes da cadeia polipeptídica recém sintetizada como fosforilação, glicosilação e clivagem do peptídeo N-terminal. Dois transportadores de aminoácidos (HS177.0087 e HS251.0297) possuem prováveis sítios de glicosilação NX(S/T) (WYSZYŃSKA et al., 2007), portanto, é possível que estes transportadores também sejam regulados por glicosilação em *H. seropedicae*.

4.3.2 Proteínas de flagelo

Proteínas estruturais do flagelo estão entre as proteínas mais abundantes no secretoma de *H. seropedicae*. A flagelina e a proteína 2 associada ao gancho do flagelo são exportadas e formam parte do filamento do flagelo. Diversos estudos (KOMORIYA et al., 1999; HOMMA et al., 1985; MINAMINO & MACNAB, 1999; KIM et al., 2005) mostraram que componentes do flagelo estão entre as proteínas mais abundantes do secretoma. A presença destas proteínas fora da célula não é resultado de uma secreção intencional, mas é normalmente ocasionada por um “vazamento” que ocorre durante o processo de biossíntese do flagelo. A aeração interfere na quantidade de flagelina liberada. Quanto mais vigorosa a agitação, maior a quantidade de flagelina presente na solução sobrenadante tendo em vista que o contato dos filamentos de flagelo com bolhas de ar causa despolimerização dos filamentos e consequente liberação no meio de cultura (KOMORIYA et al., 1999).

A proteína flagelina (FliC) foi identificada em 5 bandas diferentes. Em 4 formas, esta migrou em um pI mais ácido que o teórico, enquanto que a massa molecular de todas as formas foi superior à calculada. Kazemi-Pour e colaboradores (2004) também identificaram esta proteína como múltiplas isoformas em diferentes massas e pontos isoelétricos. Diversos autores (WIELAND et al., 1985; TOTEN & LORY, 1990; THIBAUT et al., 2001; LOGAN et al., 2002) observaram a migração da FliC com massa superior à teórica e atribuíram este fato a modificações pós-traducionais.

**TABELA 8 – PROTEÍNAS COM POSSÍVEIS MODIFICAÇÕES PÓS-
TRADUCIONAIS**

| ID | %V | pl gel | MM | pl teórico | MM | %V | PROTEÍNA |
|----|------|-----------|----|---------------|----|----------|---|
| 1 | 0,30 | 7,7 | 82 | | | | |
| 2 | 0,71 | 4,9 | 76 | 5,0 | 79 | 227.0043 | Proteína 1 associada ao gancho do flagelo |
| 3 | 0,10 | 5,2 | 77 | | | | |
| 4 | 0,07 | 7,7 | 66 | | | | |
| 5 | 1,68 | 4,9 | 66 | 6,1 | | | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 6 | 1,88 | 5,1 | 65 | | 37 | 269.0717 | |
| 19 | 1,17 | 6,7 | 35 | | | | |
| 9 | 0,53 | 4,9 | 44 | | | | |
| 10 | 6,24 | 5,3 | 44 | | | | |
| 11 | 2,07 | 5,7 | 46 | 5,5 | 37 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 12 | 2,51 | 5,6 | 44 | | | | |
| 13 | 0,14 | 5,3 | 42 | | | | |
| 15 | 0,40 | 5,5 | 41 | | | | |
| 16 | 1,42 | 5,7 | 40 | 5,6 | 36 | | NADPH:quinona oxidoreductase |
| 17 | 3,22 | 5,8 | 40 | | | 286.1638 | |
| 55 | 0,81 | 6,0 | 41 | | | | |

| ID | %V | pl gel | MM | pl teórico | MM | %V | PROTEÍNA |
|----|------|-----------|----|---------------|----|----------|--|
| 21 | 0,54 | 7,3 | 43 | 6,8 | 44 | 265.0054 | Serina hidroximetiltransferase |
| 54 | 0,66 | 7,0 | 43 | | | | |
| 22 | 0,32 | 8,4 | 65 | | | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 23 | 0,42 | 8,6 | 65 | 8,3 | 68 | | |
| 24 | 1,35 | 8,9 | 65 | | | | |
| 25 | 9,04 | 9,0 | 64 | | | | |
| 26 | 0,96 | 8,5 | 41 | 6,8 | 24 | 218.0221 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 27 | 1,95 | 9,0 | 41 | | | | |
| 28 | 1,22 | 9,0 | 40 | 8,8 | 43 | 250.0431 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 31 | 0,71 | 8,9 | 40 | | | | |
| 29 | 0,15 | 9,3 | 40 | 8,7 | 40 | 251.0297 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 61 | 0,34 | 9,0 | 39 | | | | |
| 37 | 0,13 | 9,1 | 33 | 9,1 | 29 | 177.0087 | Transportador ABC – componente periplasmático |
| 38 | 0,64 | 9,4 | 33 | | | | |
| 40 | 0,22 | 9,3 | 26 | 9,3 | 23 | 284.0598 | Transportador ABC envolvido em resistência a solventes orgânicos |
| 62 | 0,54 | 9,4 | 25 | | | | |
| 45 | 2,24 | 6,7 | 19 | 5,9 | 18 | 279.0505 | Hipotética conservada |
| 46 | 1,08 | 6,9 | 19 | | | | |

| ID | %V | pl gel | MM | pl teórico | MM | %V | PROTEINA |
|-----------|-----------|-------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| 47 | 2,34 | 5,0 | 13 | 4,9 | 12 | 269.0706 | Flagelina |
| 48 | 0,12 | 4,8 | 13 | | | | |
| 49 | 0,09 | 5,4 | 14 | 5,1 | 13 | 286.1627 | Hipotética |
| 53 | 1,15 | 5,4 | 15 | | | | |

ID = identidade da banda na figura 8; **%V** = volume percentual da banda em comparação ao total de spots detectados, calculado pelo programa Imagemaster; **pl e MM gel** = pl e MM calculados pela migração das proteínas no gel 2D usando o programa Imagemaster e os marcadores de MM e faixa de pl do gel como referência; **pl e MM teórico** = pl e MM calculados pelo programa ProteinProspector a partir do banco de dados de proteínas provenientes do genoma de *H. seropedicae*; **ORF** = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

Muitas proteínas de flagelo são modificadas por glicosilação (ARORA et al., 2004; TOTTEN & LORI, 1990; THIBAUT et al., 2001; BENZ & SCHMIDT, 2002), dentre elas, a FliC de *Pseudomonas tabaci*, *P. tomato* e *P. glycinea* (TAGUCHI et al., 2006). Em *Campylobacter coli* ocorre fosforilação de resíduos de serina (LOGAN et al., 1989), enquanto a flagelina de *Halobacterium holobium* é uma glicoproteína sulfatada (WIELAND et al., 1985).

Por espectrometria de massas, foi observado que o peptídeo de massa 1626.79 Da corresponde ao peptídeo N-terminal da FliC de *H. seropedicae* sem a metionina inicial. A identidade desse peptídeo foi confirmada por dados de fragmentação usando o equipamento Maldi-ToF/ToF, que comprovaram a remoção da metionina inicial (anexo III).

A remoção da metionina N-terminal por aminopeptidases é um processo cotraducional que ocorre no citoplasma de todos os organismos (FROTTIN et al., 2006). Este fenômeno é bastante comum, principalmente em proteínas altamente expressas. A remoção da metionina interfere com a estabilidade da proteína e também funciona como um modo de reciclar este aminoácido, cuja síntese envolve elevado gasto energético para a célula. A clivagem normalmente ocorre quando o resíduo seguinte à metionina possui cadeia lateral pequena (Ala, Cys, Pro, Ser, Thr e Val). (FROTTIN et al., 2006).

O programa TerminiNator (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator2/index.html>) foi utilizado para verificar a probabilidade de clivagem da metionina N-terminal da FliC e

o resultado obtido foi uma probabilidade de 97%, o que confirma o resultado obtido por espectrometria de massas.

A proteína FlaG (HS269.0706) foi identificada em 2 locais do gel, sendo que a forma mais básica apresentou uma abundância relativa 2,5 vezes superior à forma mais ácida. A diferença entre as duas bandas (0,2 unidades de pH e 1 kDa na massa molecular) é exatamente a diferença correspondente à perda do peptídeo sinal, que faz com que seu pI aumente 0,2 unidades de pH. Assim, a forma mais abundantemente secretada é aquela que perdeu o peptídeo sinal.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO SECRETOMA DE REFERÊNCIA

O secretoma de referência de *H. seropedicae* mostrou que esta bactéria secreta um número relativamente grande de proteínas quando cultivada em meio mínimo contendo NH_4^+ como fonte única de nitrogênio em condições aeróbicas. A maioria das proteínas detectadas pertence às classes de transporte de aminoácidos periplasmáticos tipo ABC e motilidade. Também foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo energético e metabolismo de nucleotídeos, transcrição e modificações pós-traducionais. Estas proteínas tem funções bem descritas no citoplasma das células e não apresentam sinal de secreção.

Aproximadamente vinte e oito por cento das proteínas identificadas contém peptídeo sinal Sec-dependente, 3,1% sinal Tat-dependente e 33,8% foram classificadas como secretadas pelo mecanismo não clássico. Portanto, 64,6% das proteínas identificadas foram previstas como secretadas. Entretanto, quando a previsão de localização celular feita utilizando o programa PSORTb (figura 7) apenas 7% das proteínas identificadas no secretoma de *H. seropedicae* foram

classificadas como extracelulares. Para trinta e nove por cento das proteínas a previsão foi não conclusiva (marcadas como desconhecido na figura 10), portanto sua localização pode ser citoplasmática, membrana ou extracelular. Dentre as proteínas com localização inconclusiva, 53% apresentam peptídeo sinal e 23,5% são proteínas secretadas pela via não clássica. Este resultado reforça a conclusão de que a maior parte (pelo menos 76%) das proteínas encontradas nos géis bidimensionais de proteínas extracelulares com localização celular não definida pelo programa PSORTb são de fato secretadas.

4.5 ANÁLISE COMPARATIVA DE PROTEÍNAS SECRETADAS PELA ESTIRPE SELVAGEM SMR1 E MUTANTE RAMHN1

Visando determinar a presença de proteínas secretadas pelo sistema de secreção tipo III de *H. seropedicae*, foi utilizada uma estirpe mutante contendo o gene *hrcN* inativado pela presença de um transposon EZ::TNTM<TET-1>. Esta proteína é uma ATPase essencial do sistema tipo III e mutantes *hrcN* não são capazes de secretar proteínas efetadoras do SSTT (NISSINEN et al., 2007; WOESTYN et al., 1994; BLAYLOCK et al., 2006). Foram realizadas uma série de análises comparativas de proteínas secretadas por ambas estirpes em diferentes condições fisiológicas.

4.5.1 Análise de proteínas secretadas utilizando géis SDS-PAGE

O rendimento de proteínas secretadas por *H. seropedicae* é muito baixo, sendo portanto extremamente difícil realizar análises comparativas de inúmeras condições utilizando géis bidimensionais. Portanto, foi feita uma análise preliminar utilizando géis unidimensionais (SDS-PAGE) tipo PhastSystem (GE Healthcare), que

através da coloração com nitrato de prata permitem a visualização de proteínas presentes em concentrações de aproximadamente 0,1 ng por banda.

Primeiramente, foram testadas diferentes condições de cultivo, variando a fonte de carbono, concentração de fosfato, concentração de amônio, temperatura e aeração. As fontes de carbono utilizadas foram malato e succinato. A mistura de fosfatos foi adicionada nas concentrações de 5 mL/L ou 50 mL/L. Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl nas concentrações 2 ou 20 mmol/L. As temperaturas testadas foram 28°C, 30°C e 32°C. A agitação utilizada foi de 80, 100 e 120 rpm. Também foram utilizados os flavonóides quercitina e naringenina (50 $\mu\text{mol/L}$), exsudato de raízes milho e extrato de chá verde como possíveis indutores.

Não foi possível identificar proteínas diferencialmente expressas na presença de nenhum dos possíveis indutores e tampouco em diferentes temperaturas ou agitação.

4.5.2 Análise de proteínas secretadas pelas estirpes SmR1 e mutante

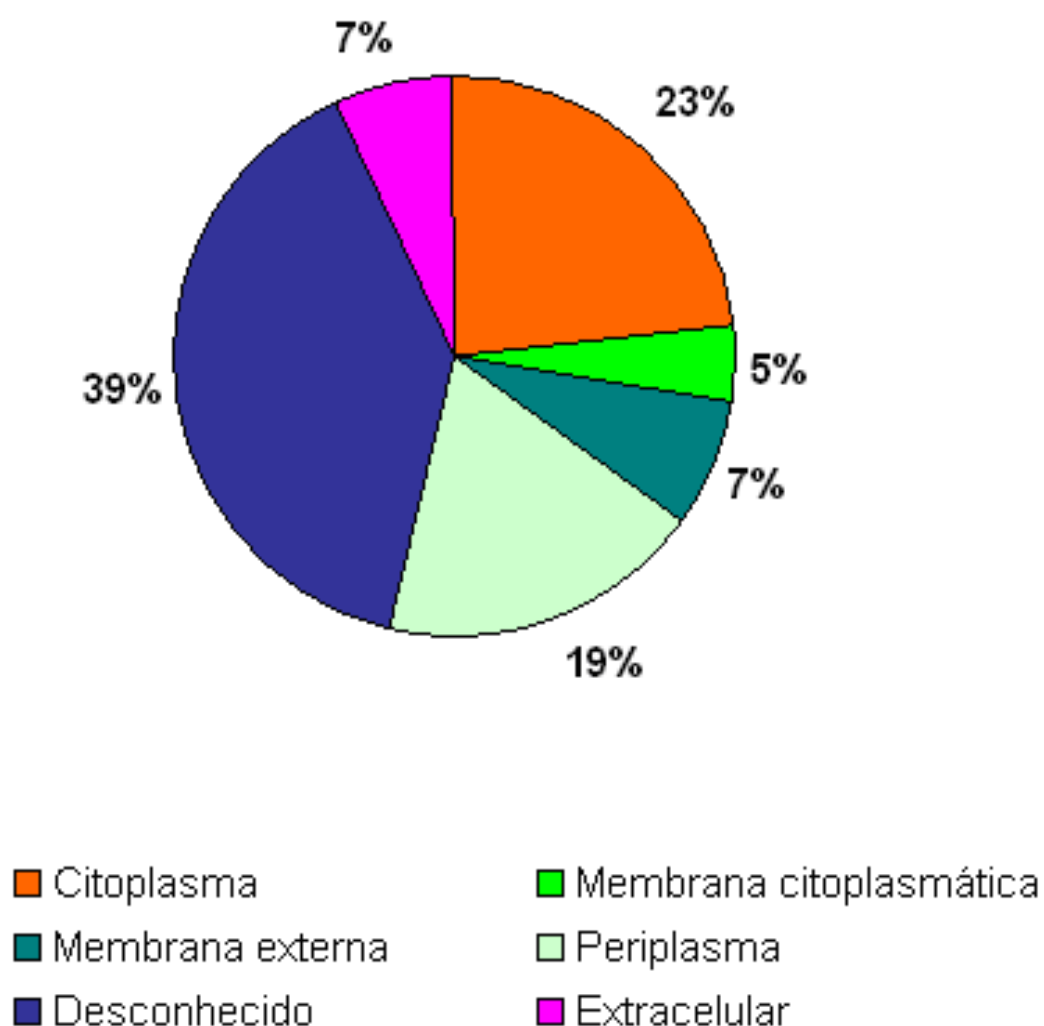
(RAMHN1) de *H. seropedicae* utilizando eletroforese bidimensional

As análises eletroforéticas bidimensionais de proteínas extracelulares de *H. seropedicae*, estirpes SmR1 e RAMHN1 foram feitas em triplicata biológica e o perfil observado foi muito semelhante nas duas estirpes (figura 11).

A única diferença detectada foram diferentes isoformas da proteína FliD (HS255.0091) (destaque, figura 11). Esta proteína esteve presente nas duas estirpes como múltiplas isoformas. Na estirpe selvagem, as isoformas migraram com massa molecular aparente (MM) entre 63 e 65 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 7,6 e 9,8, sendo que a maioria focalizou entre os pIs 9,5 e 9,8. Na estirpe mutante,

as isoformas migraram com MM ligeiramente superior, entre 68 e 70 kDa e pI entre 7,0 e 9,9, sendo que a maioria focalizou entre os pIs 8,6 e 9,0. Estes resultados

FIGURA 10: LOCALIZAÇÃO CELULAR PREVISTA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO SECRETOMA DE *H. seropedicae*



A previsão da localização celular foi feita utilizando o programa PSORTb v2.0.4 (<http://www.psort.org/psortb/>).

indicam que há diferenças na regulação pós-traducional desta proteína. Aparentemente, a proteína FliD da estirpe mutante é mais extensamente modificada que a da estirpe selvagem.

Recentemente foi demonstrado que em *Pseudomonas aeruginosa* existe um controle cruzado negativo entre proteínas do SSTT e as envolvidas na montagem do flagelo, sendo que a motilidade e/ou a montagem do flagelo são antagonistas ao SSTT. Foi observado que em estirpes sem flagelo, a expressão dos genes do sistema de secreção tipo III esteve aumentada. Por outro lado, a expressão de genes de proteínas do flagelo e a motilidade estiveram diminuídas em uma estirpe superexpressando ExsA, um regulador do SSTT, enquanto mutantes no gene que codifica a proteína do filamento do flagelo ($\Delta fliC$) apresentaram um SSTT supereficiente (SOSCIA et al., 2007). Portanto, é possível que na estirpe mutante RAMHN1, a ausência de um SSTT funcional tenha induzido a expressão e/ou modificações de proteínas do aparato do flagelo.

Excluindo a FliD, não foi detectada nenhuma outra proteína expressa exclusivamente pela estirpe selvagem ou mutante. A ativação do sistema de secreção tipo III de organismos nos quais este já foi bem caracterizado requer a presença de um indutor que é específico para cada espécie. Em outros casos, somente após contato com a célula hospedeira ocorre a ativação deste sistema.

Proteínas secretadas pelo sistema tipo III da bactéria fitopatogênica *Pectobacterium atrosepticum* já foram estudadas e foi definido um meio mínimo que mimetiza o apoplasto da planta e é capaz de induzir a secreção destas proteínas *in*

vitro (MATTINEN et al., 2007). Foram feitos estudos de secretoma em meio indutor e também extratos de plantas e os mapas bidimensionais resultantes foram comparados utilizando a estirpe selvagem e uma estirpe mutante no gene *hrpG*, que codifica para um regulador da expressão do SSTT ($\Delta hrpG$). Não foi possível observar nenhuma diferença no secretoma destas estirpes; pelo contrário, em todas as condições analisadas, foi observado um maior número de proteínas na estirpe mutante (MATTINEN et al., 2007). Resultados similares foram obtidos por Kazemi-Pour e colaboradores (2004), que analisaram comparativamente o secretoma da estirpe selvagem e uma estirpe mutante *hrpG* de *Erwinia chrysanthemi*. Foram identificadas diversas proteínas relacionadas com virulência, entretanto, não foi possível identificar nenhuma proteína diferencialmente secretada entre as duas estirpes.

Tal fato por ser resultado da metodologia utilizada, que permite visualizar e identificar apenas proteínas muito abundantes. Se as proteínas do sistema tipo III são expressas em baixas concentrações é possível que sua presença nestes géis seja muito fraca para ser visualizada ou ainda, sua presença pode ser mascarada por proteínas mais abundantes que migram em locais próximos impedindo portanto sua identificação.

Até o presente momento, apenas 1 trabalho demonstrou a secreção de proteínas pelo sistema tipo III utilizando géis bidimensionais. Para isso, Nissinen e colaboradores (2007) utilizaram culturas de *Erwinia amylovora* cultivadas em um meio indutor bem definido, concentraram as proteínas 5000 vezes e utilizaram coloração com prata. Com esta metodologia, 6 proteínas candidatas foram identificadas, mas a qualidade destes dados devido às baixas concentrações foi ruim

o que fez com que estes autores tivessem que utilizar uma metodologia complementar (nano LC-ESI-MS/MS) para identificar um maior número de proteínas e confirmar a identidade das mesmas.

Apesar da identificação de proteínas pouco abundantes ser mais difícil, é possível visualizá-las utilizando métodos de coloração mais sensíveis, como a coloração com nitrato de prata. Após análise dos géis corados com Coomassie, os mesmos foram corados com prata para verificar se havia alguma diferença entre as estirpes, mas nenhuma diferença adicional foi detectada.

Outra alternativa é a necessidade de um indutor para identificar as proteínas secretadas pelo sistema tipo III. Entretanto, indutores já conhecidos foram utilizados por Mattinen e colaboradores (2007) e estes tampouco tiveram sucesso. Alternativamente, estes autores sugeriram que tendo em vista que proteínas efetoras do tipo III são necessárias em um estágio inicial na interação planta-bactéria, estas poderiam estar ausentes em culturas na fase estacionária, estágio no qual a maioria dos estudos foram feitos.

O aparato de secreção tipo III e o flagelo bacteriano possuem diversas características em comum, e já foi demonstrado que o flagelo é capaz de secretar proteínas (KONKEL et al., 2004; YOUNG et al., 1999). A diferença essencial entre os dois é que apenas o SSTT é capaz de translocar as proteínas diretamente até o citoplasma da célula hospedeira. Portanto, é possível que, na ausência do SSTT, o flagelo poderia funcionar como maquinaria de secreção, o que explicaria a ausência de diferença entre estas estirpes. Entretanto, o flagelo não é capaz de translocar proteínas para o interior da célula hospedeira (BLOCKER et al., 2003), o que justificaria avirulência ou virulência diminuída nestes mutantes.

Estudos de secretoma utilizando mutantes no sistema tipo III, no aparato flagelar e duplo mutante de bactérias cujos indutores do SSTT já foram bem estabelecidos poderiam ajudar a esclarecer esta questão.

4.6 INDUÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III POR HrpL

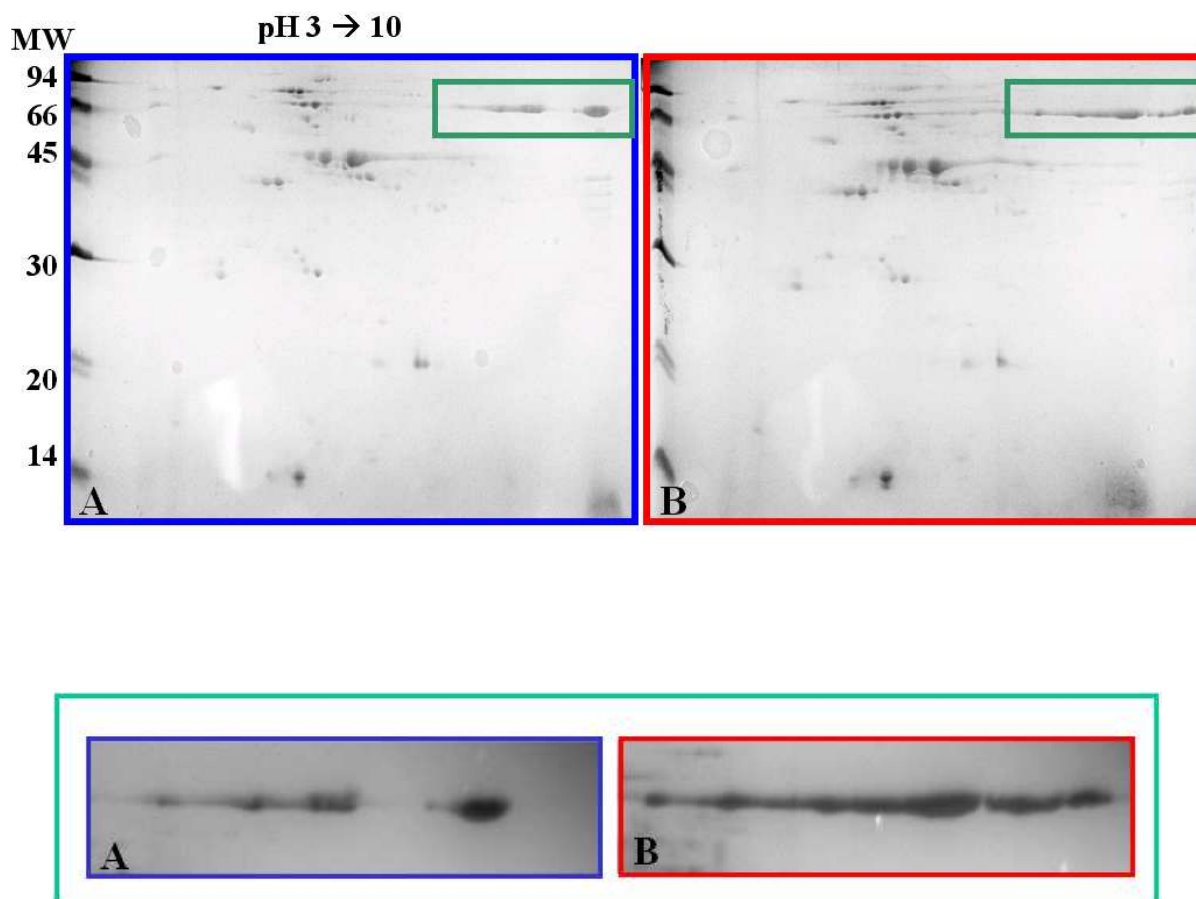
Wei e Beer (1995) mostraram que HrpL de *Erwinia amylovora* funciona como regulador transcricional positivo ativando a transcrição de *hrpN* e todos os genes *hrp* necessários para sua secreção. A expressão de *hrpL* a partir do promotor *lac* constitutivo é suficiente para ativar a expressão dos genes *hrpK*, *hrpJ*, *hrpU*, *hrpC*, *hrpZ*, *hrmA* e diversos genes *avr* em *P. syringae* (XIAO et al., 1994). A expressão de *hrpL* é regulada por fatores ambientais, sendo que em *E. amylovora*, ela é regulada pela concentração de íons amônio, histidina, asparagina, ácido nicotínico, pH e temperatura (WEI et al., 1992).

Como em *H. seropedicae* os fatores que ativam a expressão dos genes *hrp* ainda não foram identificados, a nossa estratégia foi construir uma estirpe de *H. seropedicae* expressando *hrpL* constitutivamente (SmR1-pDS1). Para isto foi construído o plasmídeo pDS1 (pLAFR3.18 com o gene *hrpL* sob controle de um promotor *lac* constitutivo em *H. seropedicae*).

4.6.1 Análise comparativa de proteínas secretadas pelas estirpes SmR1 e SmR1-pDS1 de *H. seropedicae*

Utilizando géis bidimensionais não foi possível detectar proteínas diferencialmente secretadas pela esta estirpe SmR1-pDS1 (figura 12). Existem quatro alternativas para explicar tal resultado: i) a proteína HrpL não estava sendo expressa em quantidades suficientes ou na forma não funcional, ii) sua expressão

FIGURA 11 - GEL COMPARATIVO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS SECRETADAS PELAS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTE RAMHN1



A) Gel 2D de proteínas secretadas por *H. seropedicae* estirpe Smr1; **B)** Gel 2D de proteínas secretadas pela estirpe RAMHN1 de *H. seropedicae*. Em destaque: diversas isoformas da proteína FliD (HS255.0091). A primeira dimensão foi realizada em tiras IPG faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 12,5%. Os géis foram corados utilizando Coomassie colloidal. As amostras continham 100 µg de proteína total.

não é capaz de ativar o sistema de secreção tipo III de *H. seropedicae*, iii) o sistema tipo III de *H. seropedicae* não é funcional , iv) a secreção destas proteínas por *H. seropedicae* é mínima, e portanto, mesmo utilizando esta metodologia sua detecção não foi possível. Para verificar a última alternativa (iv, baixos níveis de expressão das proteínas secretadas), as mesmas comparações foram feitas utilizando géis PhastSystem corados com prata, onde é possível detectar concentrações de proteína a partir de 0,1 ng por banda. As análises foram feitas em quintuplicata e tampouco nestas condições foi possível detectar proteínas induzidas na estirpe Smr1- pDS1.

4.6.2 Análise comparativa de proteínas na fração de membrana das estirpes

SmR1, mutante RAMHN1 e mutante SmR1-pDS1 de *H. seropedicae*

A maioria das proteínas que fazem parte do aparato de secreção do sistema tipo III está localizada na membrana interna das células bacterianas (ALFANO & COLLMER, 1997; GALAN & COLLMER, 1999; HUECK, 1998). Tendo em vista que não foi possível detectar proteínas diferencialmente secretadas, uma nova tentativa foi realizar análise proteômica da fração de membrana para verificar possível indução de proteínas na estirpe SmR1-pDS1. Portanto, foram preparadas proteínas da fração de membrana das estirpes selvagem SmR1 e as estirpes RAMHN1 e SmR1-pDS1. As análises foram feitas primeiramente utilizando eletroforese desnaturante SDS-PAGE, e posteriormente, eletroforese bidimensional na faixa de pH 3 – 10. Em nenhuma das condições foi possível detectar proteínas diferencialmente expressas.

A presença de proteínas do aparato de secreção tipo III e de eventuais proteínas secretadas não pode ser detectada em *H. seropedicae* nas condições experimentais utilizadas.

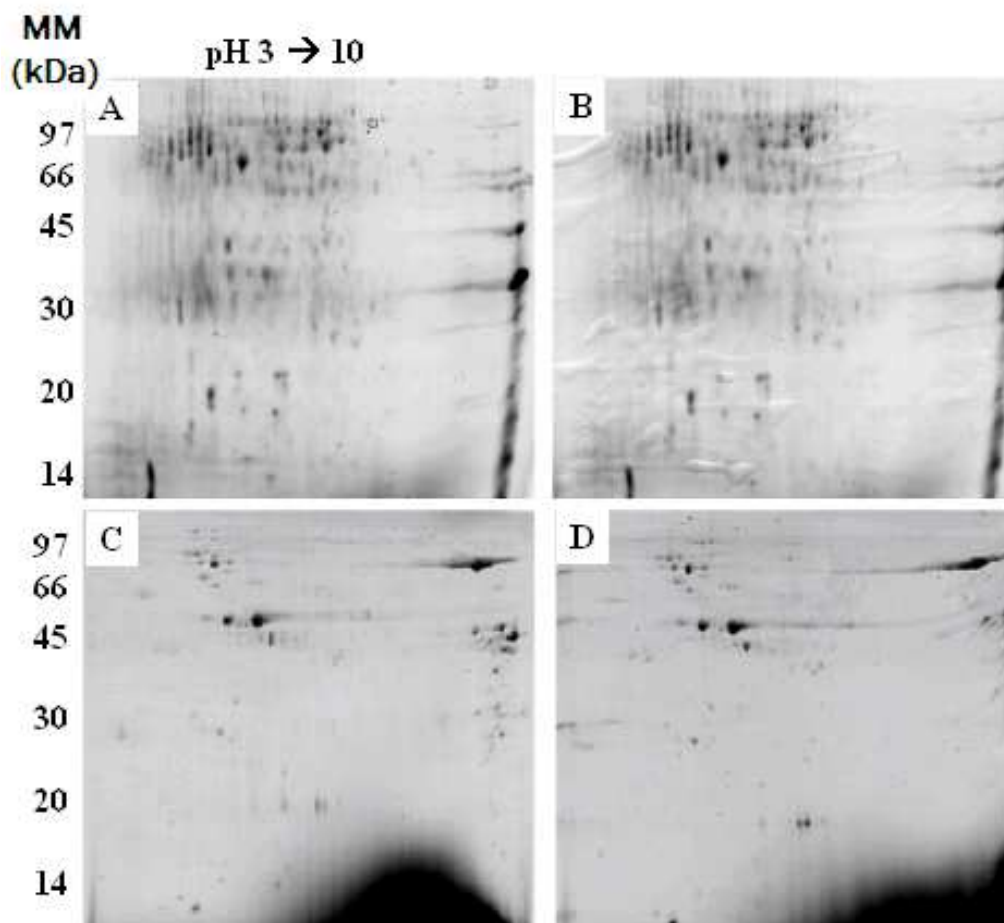
4.7 ANÁLISE *IN VIVO* DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III DE *H. seropedicae*

A proteína AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* pv tomato (massa molecular de 59 kDa) é secretada pelo sistema tipo III e induz resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas de tomate que possuem a proteína de resistência Pto (ABRAMOVITCH et al., 2003) ou em plantas não-hospedeiras como soja e tabaco. A resposta de hipersensibilidade pode ser definida como uma resposta de defesa do hospedeiro que envolve morte celular rápida e localizada, o que limita o crescimento do patógeno (ALFANO & COLLMER, 2004). Em plantas susceptíveis não ocorre HR, mas sim o aparecimento de sintomas típicos da doença.

Tang e colaboradores (1996) demonstraram indução de resposta de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco inoculadas com *Agrobacterium* EHA105 expressando a proteína AvrPtoB de *P. syringae*. A mesma estratégia já foi utilizada por diversos pesquisadores (ZIPFEL et al., 2004; JAMIR et al., 2004; RATHJEN et al., 1999) para elucidar a função de diferentes proteínas efetoras ou o efeito de mutações em diferentes domínios de uma determinada proteína.

Para verificar a funcionalidade do sistema tipo III de *H. seropedicae in vivo*, um plasmídeo contendo o gene que codifica para a proteína AvrPtoB de *P. syringae* foi transformado na estirpe selvagem, SmR1 e na estirpe mutante RAMHN1 originando as estirpes SmR1-173 e *hrcN*-173. Os transformantes de *H.*

FIGURA 12 - GEL COMPARATIVO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS SECRETADAS E PROTEÍNAS DE MEMBRANA DAS ESTIRPES SMR1 E SMR1-DS1



A) Gel 2D de proteínas de membrana da estirpe SmR1-pDS1; **B)** Gel 2D de proteínas de membrana da estirpe SmR1; **C)** Gel 2D de proteínas secretadas pela estirpe SmR1-pDS1; **D)** Gel 2D de proteínas secretadas pela estirpe SmR1.

seropedicae foram utilizados para inocular plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, cultivar Santa Cruz Kada Gigante).

4.7.1 Experimento 1

As plantas foram cultivadas em sala fechada com iluminação artificial e temperatura ambiente (fotoperíodo de 12 horas). A inoculação foi feita aplicando-se 5 µL de cultura saturada sobre um pequeno furo na face frontal da folha. Foram utilizadas as estirpes SmR1, RAMHN1, *hrcN* -173, SmR1-173 e somente meio NFb-malato como controle.

As plantas que foram inoculadas somente com meio de cultura ou com as estirpes SmR1 e RAMHN1 não apresentaram nenhum sintoma visível de doença, ou apenas um pequeno halo castanho claro ao redor do ponto de inoculação (figura 13, A).

As estirpes selvagem e mutante contendo a proteína AvrPtoB apresentaram sintomas do tipo lesão molhada (anasarca) a partir do 12º dia de inoculação. A lesão causada pela estirpe *hrcN* -173 propagou-se pela folha, enquanto que a causada pela estirpe selvagem SmR1 ficou restrita ao ponto de inoculação (figura 13).

4.7.2 Experimento 2A

O segundo experimento foi realizado com plantas cultivadas na casa de vegetação. Tendo em vista o tempo que demorou para o aparecimento dos sintomas no experimento 1 (12 dias), a metodologia de inoculação foi alterada para permitir um inóculo maior de bactérias. Aproximadamente 200 µL de cultura em D.O.₆₀₀ = 0,8 foram infiltradas nas nervuras da face dorsal das folhas utilizando uma seringa hipodérmica.

Com esta metodologia, os primeiros sintomas puderam ser vistos após o 7º dia de inoculação. Os resultados observados em plantas inoculadas com os controles foram semelhantes ao experimento 1. Algumas folhas inoculadas com ambas estirpes contendo a proteína AvrPtoB apresentaram necrose local enquanto outras apresentaram necrose juntamente com clorose. Os casos mais drásticos resultaram em morte da folha após um período de 21 dias (figura 13).

4.7.3 Experimento 2B

O experimento 2B foi realizado nas mesmas plantas que o experimento 2A, porém em folhas que não haviam sido inoculadas e encontravam-se em perfeitas condições. Tendo em vista os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2A, duas mudanças foram feitas no experimento 2B: as células foram lavadas em água estéril e depois ressuspendidas em meio NFb-malato, sendo ajustadas para uma D.O.₆₀₀ = 0,8 e foi feito um controle adicional, utilizando um lisado de proteínas de SmR1-173 (item 3.1.10). Este lisado foi inoculado do mesmo modo que as bactérias, sendo que cada folha recebeu aproximadamente 16 µg de proteína.

Neste experimento, os resultados diferiram um pouco do experimento 2A. Algumas folhas inoculadas com a estirpe SmR1 apresentaram necrose no ponto de inoculação e outras aspecto amarelado (clorose). Algumas folhas inoculadas com RAMHN1 apresentaram aspecto amarelado, porém nenhuma apresentou necrose.

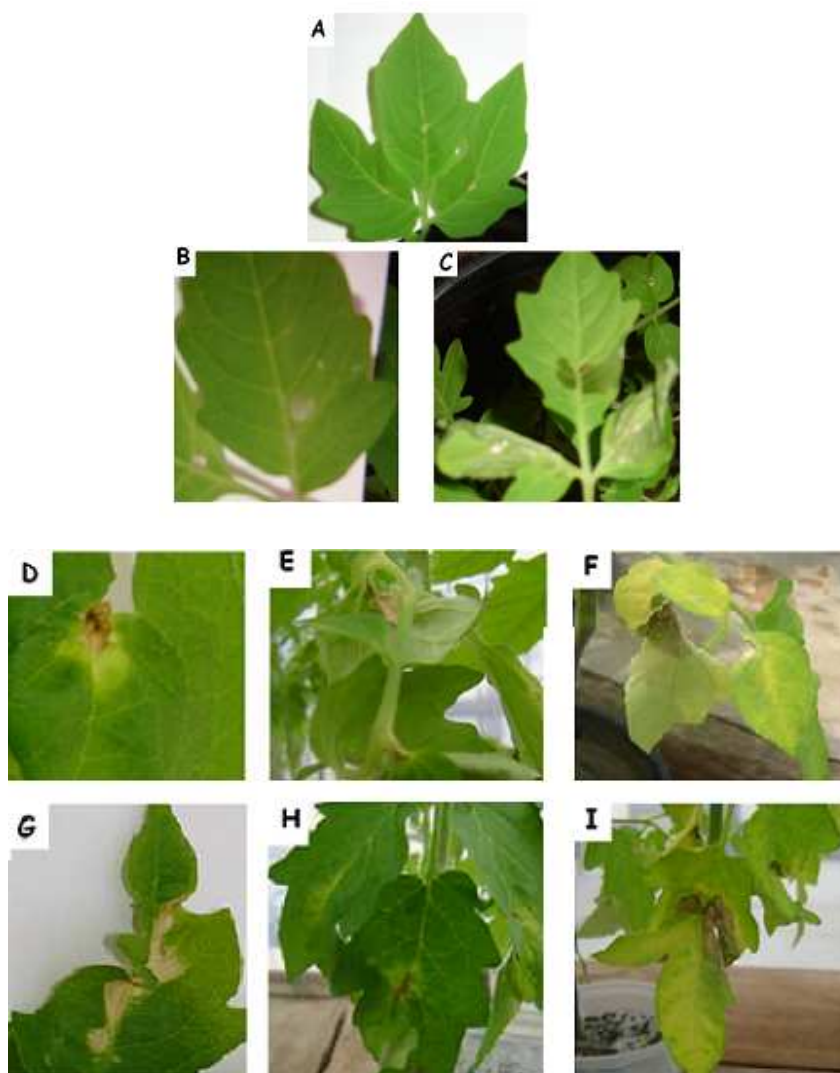
As folhas inoculadas com SmR1-173 apresentaram necrose e clorose e resultados semelhantes, porém menos agressivos foram observados nas folhas inoculadas com *hrcN*-173. As folhas que foram inoculadas com extrato celular de *H. seropedicae* apresentaram um halo castanho, de formato regular, porém sem necrose, aspecto amarelado ou lesão molhada (figura 14).

Olivares e colaboradores (1997) mostraram que folhas de cana-de-açúcar inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram formação de uma pequena área necrótica ao redor do ponto de inoculação, o que impede o avanço da colonização bacteriana. O mesmo sintoma foi observado em folhas de tomateiro inoculadas com as estirpes SmR1 e RAMHN1 no experimento 2A (figura 13). Nos experimentos de Olivares e colaboradores (1997) a metodologia empregada foi semelhante ao experimento 2A, no qual a densidade ótica das culturas foi ajustada sem que houvesse uma etapa de lavagem das células.

Além dos mecanismos de defesa dependentes dos genes R, as plantas possuem sistemas de percepção basais mais amplos, que respondem a padrões característicos de determinados microrganismos (ZIPFEL et al., 2004). Bactérias não fitopatogênicas (como *E.coli* e *P. fluorescens*) e mutantes patogênicos com sistema de secreção tipo III não funcional ocasionam uma resposta de defesa conhecida como resistência basal (NIMCHUK et al., 2003). Exemplos de moléculas capazes de ocasionar resposta de defesa em plantas são a quitina e ergosterol de fungos e a flagelina e lipopolissacarídeos de bactérias (ZIPFEL et al., 2004).

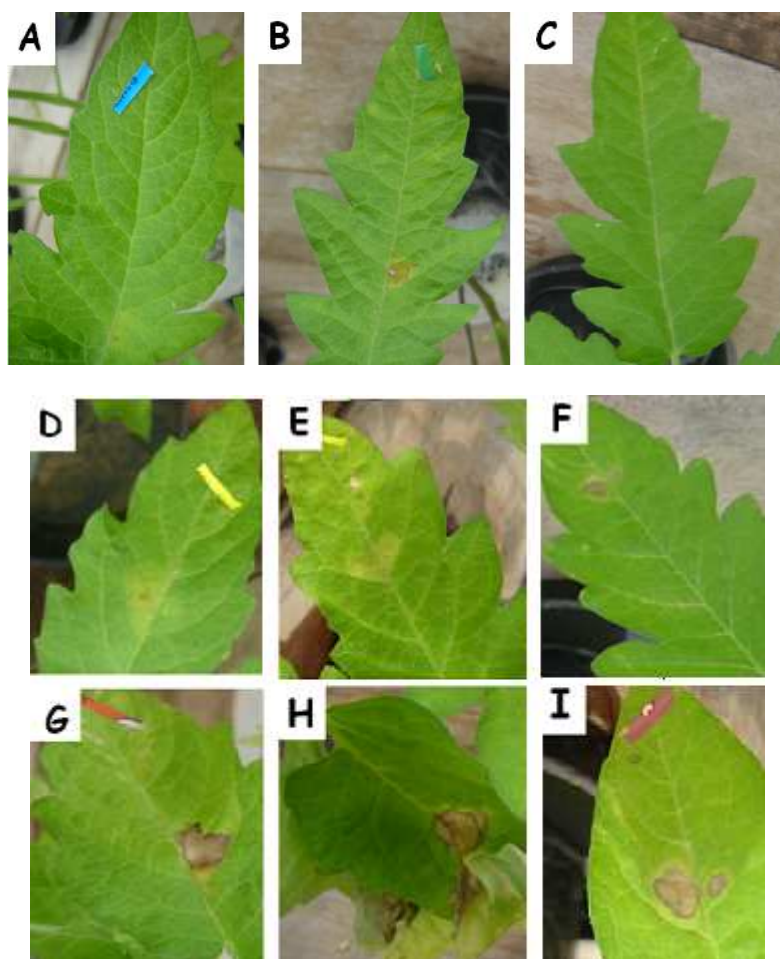
No experimento 2B, em que foram utilizadas células de *H. seropedicae* lavadas, apenas as folhas inoculadas com a estirpe SmR1 apresentaram necrose localizada. Este sintoma não foi observado quando se inoculou o mutante RAMHN1. Portanto, é provável que a resposta de defesa ocasionada nas plantas pela presença de SmR1 seja dependente de alguma molécula ativamente secretada por

**FIGURA 13 - FOTOS DAS FOLHAS DE TOMATE INOCULADAS COM AS
ESTIRPES Smr1, RAMHN1, Smr1-173 E *hrcN*-173 DE *H. seropedicae* -
EXPERIMENTOS 1 E 2A**



A - C = experimento 1; D - I = experimento 2A. A) Estirpe SmR1 de *H. seropedicae*; **B)** *hrcN*-173; **C)** SmR1–173. Fotos tiradas 12 dias após inóculo, experimento 1; **D)** *hrcN*-173 (7 dias) ; **E)** *hrcN* - 173 (15 dias); **F)** *hrcN*-173 (21 dias); **G)** SmR1 – 173 (7 dias); **H)** SmR1 – 173 (15 dias); **I)** SmR1 – 173 (21 dias). As plantas de tomate foram cultivadas em ambiente fechado com iluminação artificial e fotoperíodo de 12 horas.

**FIGURA 14 - FOTOS DAS FOLHAS DE TOMATE INOCULADAS COM AS
ESTIRPES Smr1, RAMHN1, Smr1-173 E *hrcN*-173 DE *H. seropedicae* -
EXPERIMENTO 2B**



A) RAMHN1; **B)** SmR1; **C)** meio NFb-malato; **D)** *hrcN*-173 (7 dias) ; **E)** *hrcN*-173 (15 dias); **F)** extrato de proteínas celulares da estirpe SmR1-173 (7 dias); **G)** SmR1 – 173 (7 dias); **H)** SmR1 – 173 (15 dias); **I)** extrato de proteínas celulares da estirpe SmR1-173 (15 dias)

esta bactéria durante a infecção. Se esta molécula estivesse presente no meio extracelular das culturas da estirpe RAMHN1 como resultado de lise celular teria sido removido pela lavagem das células. É possível que a molécula reconhecida pela planta seja secretada, tendo em vista que quando foram utilizadas culturas lavadas, a estirpe mutante RAMHN1 não foi capaz de elicitar tal resposta.

As estirpes expressando a proteína AvrPtoB de *P. syringae* induziram sintomas mais severos que os controles. Os sintomas observados não podem ser denificados como HR tendo em vista a demora para o aparecimento dos sintomas. HR clássica manifesta-se em um prazo de aproximadamente 24 horas e os sintomas aqui observados demoraram, no mínimo, 7 dias. Adicionalmente, sintomas de HR são limitados ao local do inóculo e nas folhas inoculadas com as estirpes SmR1-173 e *hrcN*-173 os sintomas se espalharam, muitas vezes por toda a superfície da folha.

A partir dos fenótipos observados em plantas inoculadas com as estirpes mutante e selvagem expressando a proteína AvrPtoB, não se pode afirmar se esta proteína foi secretada pelo sistema tipo III de *H. seropedicae*. Tampouco é possível saber se ela foi secretadas por algum outro sistema de secreção. O fato da estirpe mutante (RAMHN1) expressando a proteína AvrPtoB também ter causado sintomas não descarta completamente a possibilidade da secreção desta pelo sistema tipo III de *H. seropedicae*. O fenótipo característico associado à mutantes *hrp* consiste na inabilidade de causar doença em plantas susceptíveis ou HR em plantas resistentes (LINDGREN, 1997). Em *P. syringae*, inativação dos genes *hrpB*, *hrpD*, *hrpE*, *hrpF*, *hrpO*, and *hrpQ* leva à perda da capacidade de iniciar resposta hipersensitiva. Entretanto, mutantes *hrpG*, *hrpJ*, *hrpP*, and *hrpT* continuaram causando HR em plantas susceptíveis (RAMOS et al., 2007).

Os sintomas observados não podem ser atribuídos exclusivamente a uma eventual lise celular, tendo em vista que a inoculação com extrato de proteínas lisadas de SmR1-173 não ocasionaram sintomas semelhantes aos observados na presença da bactéria. Alternativamente, a presença desta proteína nas células de *H. seropedicae* pode ter causado um efeito pleiotrópico na expressão de outras moléculas efetoras.

Keen e colaboradores (1990) mostraram que o gene *avrD* de *P. syringae* expresso em *E. coli* foi capaz de induzir HR pronunciada em folhas de soja. Estas células não apenas induziram uma resposta necrótica hipersensitiva local (como a induzida por *P. syringae*), como também necrose que se espalhou a partir do ponto de inóculo em direção à margem das folhas. Sintomas estes semelhantes aos observados nas estirpes de *H. seropedicae* com AvrPtoB. Adicionalmente, o lisado de células de *E. coli* expressando altos níveis de AvrD não foi capaz de produzir tal resposta, mesmo quando altas concentrações (1 mg/mL) da proteína parcialmente purificada. O iniciador de HR foi identificado como sendo uma proteína pequena (MM entre 6 e 8 kDa) que provavelmente foi induzida em *E. coli* pela presença de AvrD de *P. syringae* (KEEN et al., 1990).

Portanto, mecanismos semelhantes podem ser responsáveis pelos fenótipos observados em plantas inoculadas com *H. seropedicae* contendo a proteína AvrPtoB de *P. syringae*. Tendo em vista que a proteína ou proteínas capazes de serem reconhecidas pelo hospedeiro são moléculas secretadas, foram feitas análises do secretoma destas estirpes e comparadas com a estirpe selvagem.

4.8 ANÁLISE COMPARATIVA DAS ESTIRPES SmR1-173 e *hrcN*-173

4.8.1 Proteínas diferencialmente secretadas nas estirpes SmR1-173 e *hrcN*-173

Primeiramente, foram comparados os géis de referência das proteínas secretadas pelas estirpes selvagem e RAMHN1 com os géis das proteínas secretadas por estas mesmas estirpes contendo a proteína AvrPtoB (SmR1-173 e *hrcN*-173). Tendo em vista que não foram detectadas proteínas diferencialmente expressas nas análises comparativas entre as estirpes RAMHN1 e SmR1, o gel de referência de SmR1 (item 4.1) foi utilizado para estas comparações. Não foram feitas análises quantitativas, mas apenas qualitativa, ou seja presença ou ausência da proteína.

A comparação entre os géis de proteínas secretadas pelas estirpes SmR1 e SmR1 (AvrPtoB) mostrou um número maior de proteínas secretadas pela estirpe SmR1 (AvrPtoB) (figura 15). Para verificar se a presença destas proteínas adicionais foram resultantes de lise celular, uma comparação com o proteoma celular desta mesma estirpe foi conduzida. Como pode ser visto na figura 15 (C e D), apareceram várias proteínas celulares que não haviam sido detectadas no gel do secretoma de referência da estirpe SmR1. Portanto, a contaminação da fração extracelular com proteínas decorrentes de lise celular não pode ser descartada. Entretanto, o perfil dos dois extratos não é o mesmo. Algumas proteínas altamente abundantes no proteoma celular estiveram ausentes no secretado. Opostamente, algumas proteínas foram detectadas exclusivamente no secretoma.

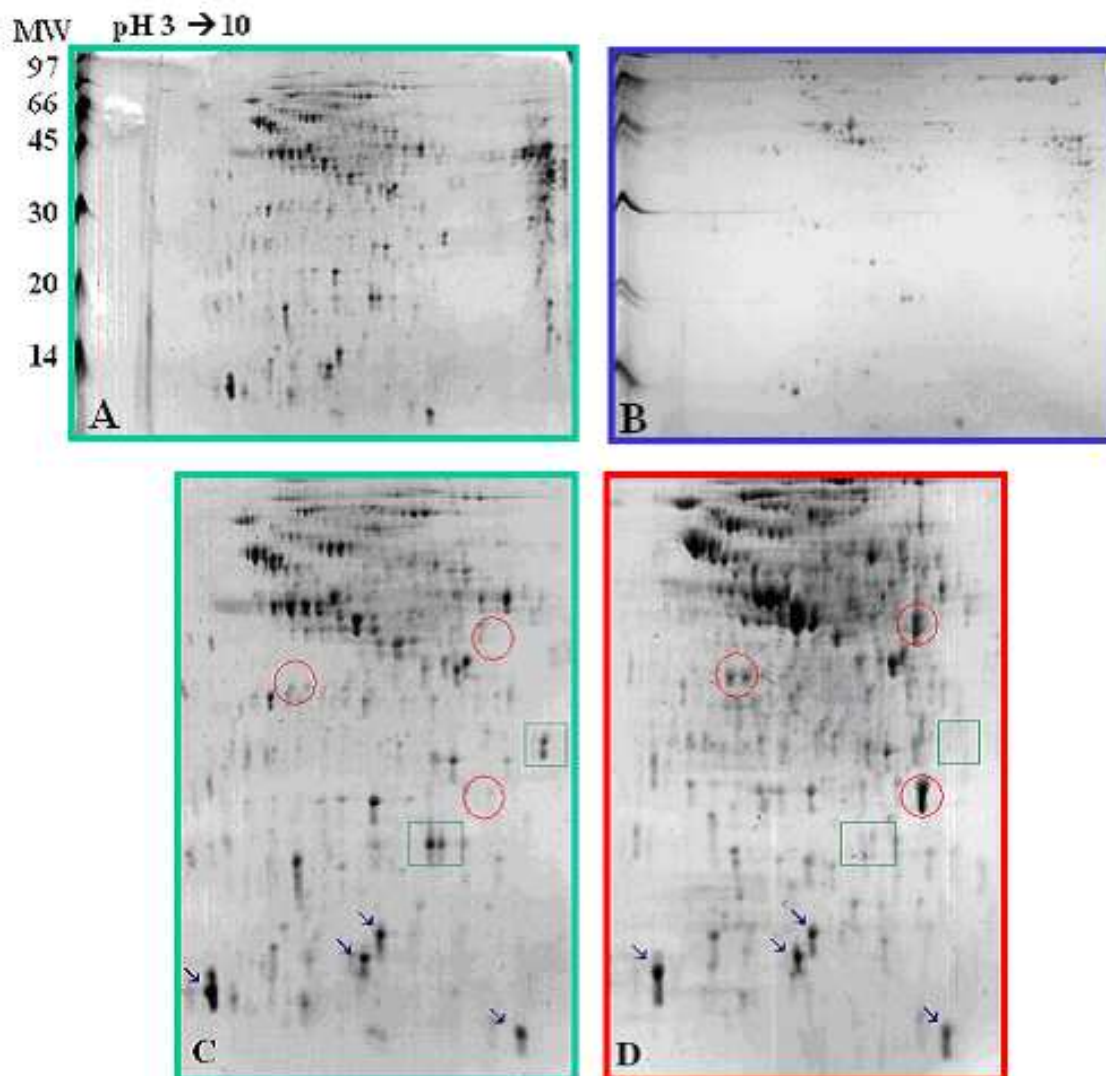
A tabela 9 mostra as proteínas secretadas que foram induzidas pela presença do plasmídeo contendo o gene que codifica para a proteína AvrPtoB em ambas

estirpes de *H. seropedicae*. Dentre elas, foram identificadas por espectrometria de massas duas hidrolases: HS285.0348 e HS220.0114. A primeira contém um domínio amidase e a segunda um domínio do tipo alfa/beta. Hidrolases com estes domínios já foram identificadas em diversos secretomas (HIROSE et al., 2000; EVANS et al., 2007; BOEKHORST et al., 2006). Entretanto, ainda não foi definida qualquer função específica para estas enzimas no ambiente extracelular. Outra enzima induzida também identificada em outros secretomas foi a isocitrato desidrogenase (KIM et al., 2005; WALZ et al., 2007).

A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) não foi identificada no secretoma de referência de *H. seropedicae*, mas foi identificada no secretoma da estirpe SmR1-173. Esta enzima também foi identificada extracelularmente em diversos organismos como *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus anthracis* e *Pectobacterium atrosepticum* (HIROSE et al., 2000; KIM et al., 2005; LAMONICA et al., 2005; MATTINEN et al., 2007; WALZ et al., 2007).

Apesar de GAPDH ser uma enzima da via glicolítica, ela possui um grande número de funções secundárias, como atividade de fosfotransferase/quinase, sendo capaz de autofosforilação e também fosforilação de outras proteínas (KAWAMOTO & CASWELL, 1986) e ligação ao RNA para regular a tradução (NAGY & RIGBY, 1995) e atividade reparadora de DNA (MEYER-SIEGLER et al., 1991). Dastor e Dreyer (2001) demonstraram o envolvimento de GAPDH na apoptose e estresse oxidativo. Mais recentemente, Tsunezuka e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão de GAPDH é aumentada quando ocorre formação de lesão em plantas e que esta enzima contribui para a morte celular em arroz.

FIGURA 15 - ANÁLISE COMPARATIVA DE ELETROFORESE 2D DA ESTIRPE SELVAGEM SMR1 COM E SEM A PROTEÍNA AvrPtoB DE *P. syringae*



A) Secretoma da estirpe Smr1-173; **B)** Secretoma de referência da estirpe SmR1; **C)** Secretoma da estirpe Smr1-173; **D)** Proteoma celular da estirpe Smr1-173. As setas indicam proteínas que foram visualizadas em ambos extratos. Os círculos mostram algumas das proteínas mais abundantes que foram identificadas exclusivamente no proteoma celular e os retângulos mostram algumas das proteínas mais abundantes do secretoma e que estão ausentes no proteoma celular.

**TABELA 9 - PROTEÍNAS SECRETADAS PELAS ESTIRPES SELVAGEM (SMR1)
E MUTANTE (RAMHN1) CONTENDO O PLASMÍDEO CODIFICANDO PARA A
PROTEÍNA AvrPtoB**

| pl exp. | MM exp. | pl teor. | MM teor. | ORF | PROTEÍNA |
|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------|--|
| 5,7 | 54 | 6,0 | 51 | 285.0348 | 6-aminohexanoato-dímero-cíclico hidrolase |
| 5,3 | 33 | 5,1 | 30 | 287.1062 | Proteína de bacteriófago relacionada ao capsídeo |
| 6,1 | 79 | 6,2 | 81 | 159.0044 | Isocitrato desidrogenase (NADP) |
| 6,4 | 30 | 6,6 | 29 | 220.0114 | Hidrolase |
| 6,3 | 52 | 6,2 | 55 | 283.0351 | ATP sintase, F0F1 subunidade alfa |
| 8,4 | 61 | 8,6 | 63 | 274.0020 | Transportador tipo Kef K ⁺ , componente de membrana |
| 5,2 | 20 | 5,3 | 18 | 287.1202 | Proteína de cauda (FII) relacionada a bacteriófago |
| 6,9 | 33 | 6,2 | 35 | 285.0028 | Malato desidrogenase |
| 7,0 | 34 | 6,1 | 29 | 267.0568 | Gliceraldeído 3-fosfato/desidrogenase |

pl e MW exp. = pl e MW experimentais calculados pela migração no gel 2D; **pl e MW teo.** = pl e MW teórico calculado pelo programa ProteinProspector; **ORF** = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

A malato desidrogenase, assim como GAPDH está presente no secretoma de diferentes microrganismos (KIM et al., 2005; EVANS et al., 2007; WALZ et al., 2007; LAMONICA et al., 2005), mas não foi encontrada no secretoma de referência de *H. seropedicae*. Esta é provavelmente uma proteína “moonlighting”, tendo em vista que já foi identificada no proteoma celular e possui função bem definida no citoplasma da célula.

Foram identificadas duas proteínas relacionadas a bacteriófago (bandas 20 e 36). Em patógenos animais, genes derivados de bacteriófago podem contribuir para patogênese. Alguns patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium botulinum* e *Corynebacterium diphtheriae* possuem fatores de virulência que são codificados pelo genoma bacteriófago (HURST et al., 2004). Entretanto, até o momento não foram relatados estudos descrevendo um mecanismo semelhante em bactérias fitopatogênicas. Estas proteínas podem ter desencadeado algum tipo de resposta quando em contato com a célula eucariótica ou ainda, ter ocasionado a lise de células o que explicaria a presença de diversas proteínas citoplasmáticas nestas estirpes.

Nenhuma das proteínas relacionadas na tabela 9 possui sequência de peptídeo sinal Sec ou Tat-dependente ou características de secreção pelo mecanismo não-clássico. Duas delas (HS285.0348 e HS283.0351) foram identificadas no proteoma celular, sendo que a última está entre as proteínas intracelulares mais abundantes (CHAVES et al., 2007).

4.8.2 Proteínas induzidas no secretoma da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* contendo a proteína AvrPtoB

Foram feitas análises comparativas entre os secretomas das estirpes SmR1-173 e *hrcN*-173. O secretoma de SmR1 expressando AvrPtoB (estirpe SmR1-173) apresentou 5 proteínas diferencialmente secretadas (tabela 10). A subunidade beta da F0F1 ATP sintase foi identificada em dois locais do gel com a mesma massa e diferentes pontos isoelétricos, sugerindo a presença de modificação pós-traducional. A subunidade beta da F0F1 ATP sintase de *Xanthomonas axonopodis* foi induzida quando este microrganismo foi cultivado em meio de cultura contendo extrato de folha (MEHTA & ROSATO, 2005).

A proteína NADPH:quinona oxidoredutase foi identificada em 4 regiões do gel, sendo que três delas estiveram presentes em ambas estirpes enquanto que a forma mais básica (ID 22) apareceu apenas na estirpe selvagem. Os dados sugerem que esta proteína é regulada diferencialmente por modificações pós-traducionais.

Ocorreram também proteínas com expressão aumentada, dentre elas o fator de alongação GTPase e uma chaperona molecular. Esta chaperona é similar à proteína HscA de *E. coli*, que faz parte da família Hsp70 de chaperonas moleculares envolvidas na biossíntese de proteínas ferro-enxofre. HscA reconhece o motivo LPPVK e é capaz de ligar-se a peptídeos que possuem esta sequência (SILBERG et al., 2004).

4.8.3 Proteínas secretadas pela estirpe mutante *hrcN*-173 de *H. seropedicae* contendo o plasmídeo codificando a proteína AvrPtoB

O secretoma do mutante *hrcN*-173 apresentou os seguintes componentes estruturais do flagelo: flagelina (FliC), proteína 2 associada ao gancho do flagelo (FliD), proteína de flagelo (FlaG) e proteína 2 associada ao gancho do flagelo (HS255.0091) (tabela 11).

Como já foi discutido anteriormente (item 4.4.2), em *P. aeruginosa* os sistemas de montagem do flagelo e/ou motilidade e o SSTT são antagonicamente regulados, tendo em vista que a ativação de um acaba reprimindo o outro (SOSCIA et al., 2007). Aqui, fica evidente que o mutante RAMHN1 possui síntese aumentada de componentes do aparato do flagelo e esta síntese é provavelmente decorrente da não funcionalidade do sistema tipo III desta estirpe.

A expressão aumentada destes componentes aparentemente tem relação direta com os sintomas que foram observados nos experimentos de inoculação de plantas de tomate. Marutani e colaboradores (2005) mostraram que mutantes $\Delta fliD$ secretam uma maior quantidade de flagelina e portanto, induzem forte HR em plantas resistentes.

A presença de maiores concentrações de FliD e FliC na estirpe mutante *hrcN* sugere que ocorreu provável alteração estrutural no flagelo, o que levou a sua despolimerização ou liberação das subunidades de flagelina e do gancho (FliD).

TABELA 10 - PROTEÍNAS INDUZIDAS NO SECRETOMA DA ESTIRPE SMR1 DE *H. seropedicae* COM O PLASMÍDEO CODIFICANDO A PROTEÍNA AvrPtoB

| pl exp. | MM exp. | pl teor. | MM teor. | ORF | PROTEÍNA |
|---------|---------|----------|----------|----------|---|
| 5,0 | 51 | 5,2 | 50 | 283.0334 | ATP sintase, F0F1 subunidade beta |
| 5,1 | 51 | 5,2 | 50 | 283.0334 | ATP sintase, F0F1 subunidade beta |
| 5,4 | 42 | 5,5 | 43 | 249.0030 | Fator de elongação de tradução TU (EF-Tu) |
| 5,4 | 41 | 5,0 | 66 | 254.0446 | Chaperona molecular |
| 5,8 | 40 | 5,6 | 36 | 286.1638 | NADPH:quinona oxidoredutase |

pl e MW exp. = pl e MW experimentais calculados pela migração no gel 2D; **pl e MW teo.** = pl e MW teórico calculado pelo programa ProteinProspector; **ORF** = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

A proteína HS255.0091 esteve presente como múltiplas isoformas, indicando que ela sofre regulação pós-traducional que altera seu pI. A flagelina (FliC) foi identificada em 2 locais do gel com aproximadamente a mesma massa, porém com pontos isoelétricos diferentes (figura 16), sugerindo que ela também é alvo de modificações pós-traducionais. A forma mais ácida, é provavelmente a forma modificada tendo em vista que esta focalizou em um pH diferente do pI calculado teoricamente. Por outro lado, a forma mais básica apresentou migração compatível com o pI e MM preditos. Ambas as formas foram diferencialmente secretadas pelo mutante, entretanto, houve também diferença entre o volume relativo das formas modificada e não modificada.

Na estirpe mutante, a forma mais ácida da FliC está presente em concentrações de aproximadamente duas vezes a concentração da forma mais básica. Na estirpe selvagem, a relação é exatamente o contrário, predominando a forma mais básica (figura 16).

Além da motilidade e quimiotaxia, o flagelo também desempenha outras funções como secreção de proteínas (GHELARDI et al., 2002; KONKEL et al., 2004; WOODS et al., 1980), adesão (ARORA et al., 1998) e como iniciador de patogenicidade ou resposta de defesa (ARORA et al., 2005; GÓMEZ-GÓMEZ & BOLLER, 2002).

Taguchi e colaboradores (2003) mostraram que a especificidade da indução da HR é determinada pela modificação pós-traducional da flagelina e que em *Pseudomonas tabaci*, *P. tomato* e *P. glycinea*, esta proteína é modificada por glicosilação. Em *Campylobacter coli* ocorre fosforilação de resíduos de serina

**TABELA 11 - PROTEÍNAS INDUZIDAS NO SECRETOMA DA ESTIRPE MUTANTE
(RAMHN1) CONTENDO O PLASMÍDEO CODIFICANDO A PROTEÍNA
AvrPtoB**

| pl exp. | MM exp. | pl teor. | MM teor. | ORF | PROTEÍNA |
|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------|---|
| 5,0 | 63 | 6,1 | 37 | 269.0717 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 5,1 | 40 | 5,5 | 37 | 269.0700 | Flagelina |
| 5,6 | 39 | 5,5 | 37 | 269.0700 | Flagelina |
| 4,7 | 13 | 4,9 | 12 | 269.0706 | Proteína de flagelo |
| 8,4 | 66 | 8,3 | 68 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 5,5 | 37 | 5,6 | 36 | 286.1638 | NADPH: quinona oxidoreductase |

pl e MW exp. = pl e MW experimentais calculados pela migração no gel 2D; **pl e MW teo.** = pl e MW teórico calculado pelo programa ProteinProspector; **ORF** = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

(LOGAN et al., 1989) e a flagelina de *Halobacterium holobium* é uma glicoproteína sulfatada (WIELAND et al., 1985).

Já foi também demonstrado que a flagelina é capaz de iniciar resposta hipersensitiva em diversas plantas como tomate, tabaco e *Arabidopsis thaliana* (FELIX et al., 1999; MARUTANI et al., 2005; TAGUCHI et al., 2003; TAKEUCHI et al., 2003; BAUER et al., 2001; FINLAY & FALKOW 1997; ZIPFEL et al., 2004). O flagelo bacteriano é composto pelo corpo basal, uma estrutura em forma de gancho e o filamento. O filamento é composto por subunidades de flagelina que vão sendo auto-montadas na extremidade distal após serem exportadas pelo flagelo. O processo de exportação e auto-montagem é determinado pelas porções conservadas N e C-terminal da flagelina, enquanto a região central é altamente variável em tamanho e sequência (SCHUSTER & KHAN 1994; FELIX et al., 1999).

O domínio mais constante e bem conservado, próximo ao N-terminal da flagelina é o responsável por iniciar a resposta hipersensitiva (GÓMEZ-GÓMEZ & BOLLER, 2002). Felix e colaboradores (1999) definiram um peptídeo que possui uma sequência consenso (figura 17) conservada em bactérias como *P. syringae*, *P. pudita*, *P. aeruginosa* e *E.coli*. Um peptídeo de 22 aminoácidos da região N-terminal da flagelina de *P. aeruginosa* (flg22) isoladamente é capaz de causar resposta hipersensitiva em plantas resistentes. Um alinhamento entre esta sequência consenso e a da flagelina de *H. seropedicae* (figura 13) mostrou que as duas sequências são 97,3% idênticas, diferindo em apenas 1 resíduo de aminoácido conservado (isoleucina → valina) . Portanto, a flagelina de *H. seropedicae* é um potencial iniciador de resposta hipersensitiva.

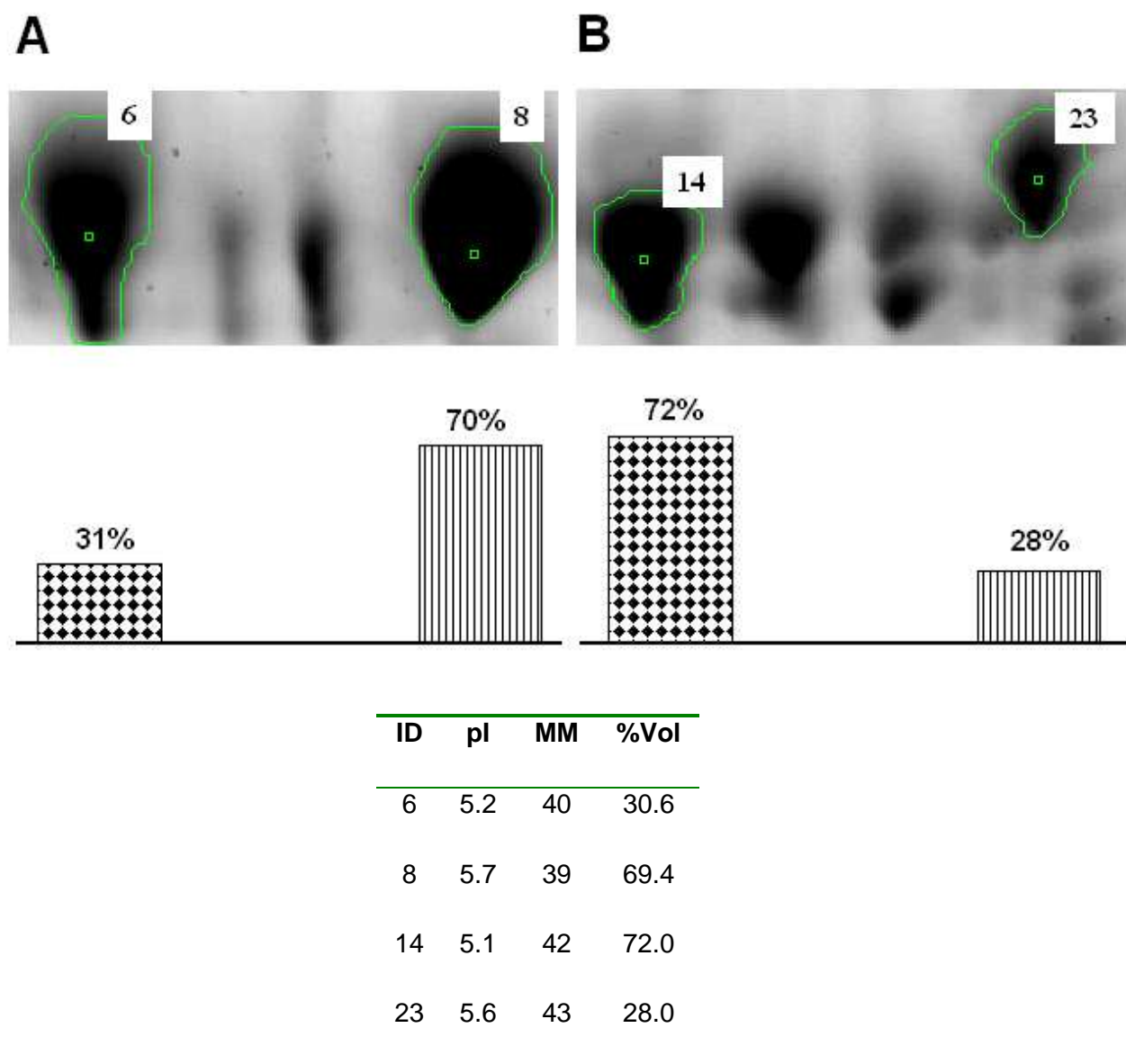
Em contrapartida, diversas preparações de flagelos provenientes de bactérias como *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* não induziram HR em células de tomate. As sequências da flagelina destas bactérias é altamente divergente e peptídeos sintetizados baseando-se nestas sequências não elicitaram resposta hipersensitiva (FELIX et al., 1999).

O flagelo é um importante fator de virulência para patógenos de animais e plantas. Tendo em vista que a maior parte das bactérias que se associam a plantas são móveis, a quimiotaxia dirigida pelo flagelo é importante na interação inicial com o hospedeiro, particularmente na rizosfera (GÓMEZ-GÓMEZ & BOLLER, 2002; FELIX et al., 1999).

A estrutura intacta do flagelo não atua como estímulo direto para o sistema de percepção, mas é necessária sua despolimerização ou fragmentação para que ocorra ativação da HR por subunidades da flagelina, que podem, por difusão entrar nas células vegetais e ligar-se a receptores específicos localizados na membrana plasmática das células das plantas (FELIX et al., 1999).

Além das proteínas do flagelo, uma isoforma da NADPH: quinona oxidoredutase foi encontrada apenas na estirpe *hrcN*. Esta forma apresentou uma massa molecular superior à teórica (migração = 54 kDa e massa teórica = 36 kDa), o que sugere adição de algum grupamento a esta proteína, ou a formação de um possível dímero.

FIGURA 16 – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE ISOFORMAS DA FLIC NAS ESTIRPES SMR1-173 E *hrcN*-173



A) Isoformas da FliC da estirpe *hrcN*-173; **B)** Isoformas da FliC da estirpe SmR1-173. O gráfico mostra o volume percentual de cada isoforma da FliC em cada estirpe, em relação ao somatório das duas.

**FIGURA 17 - COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO N-TERMINAL
CONSERVADA DA FLAGELINA COM A SEQUÊNCIA N-TERMINAL DA
FLAGELINA DE *H. seropedicae***

```

1.      INTNxxxxLxxxxxxLxxxxxxLxxxxxx RLSSGL RINSAxDDAAGxxIx xxxxxxxxxGLxxAxxNxxDGIxxxQxAE xAL
2. MASVINTNI PSLNTQRNLNASQSSINTSIQ RLSSGL RVNSAKDDAAGLAIA DRMNSQVKGLAVAQRNANDGISMAQTAE GAL
  
```

1. Sequência consenso N-terminal da flagelina de *P. syringae*, *P. pudita*, *P. aeruginosa* e *E.coli* (FELIX et al., 1999)

2. Região N-terminal da flagelina de *H. seropedicae*

Os resíduos conservados estão em negrito.

x = qualquer resíduo

Em destaque: peptídeo ativo da flagelina (flg22)

4.8.4 Considerações Finais

Análises do secretoma das estirpes mutantes mostraram que a presença da proteína AvrPtoB de *P. syringae* ocasionou mudanças no secretoma das células. Diversas proteínas que não apareceram no secretoma de referência foram identificadas, sendo muitas delas de localização teoricamente citoplasmática e apresentando funções enzimáticas. Adicionalmente, o efeito de AvrPtoB foi diferente nas estirpes selvagem e mutante *hrcN* de *H. seropedicae*.

É provável que a proteína AvrPtoB produzida em excesso tenha induzido a expressão de proteínas flagelares na estirpe *hrcN*-173, já que este mutante é incapaz de secretá-la pelo sistema tipo III. Por outro lado, esta síntese aumentada de flagelo não ocorreu na estirpe SmR1-173, que tem os genes do sistema de secreção tipo III. Estes resultados sugerem uma regulação coordenada e oposta dos genes necessários para o flagelo e o sistema de secreção tipo III.

Estes dados ajudam a entender, em parte, os sintomas observados em plantas de tomate inoculadas com estas estirpes. Os sintomas verificados pela inoculação com *hrcN*-173 foram provavelmente causados pela grande quantidade de flagelina liberada, molécula que pode funcionar como iniciadora de reposta de defesa nas plantas. Já na estirpe selvagem, os sintomas podem ser resultado tanto da secreção de AvrPtoB pelo sistema tipo III quanto resultante de proteína(s) induzidas que possuem capacidade de ativar mecanismos de defesa da planta.

5 CONCLUSÕES

- No proteoma celular de referência de *H. seropedicae* foram identificadas 207 bandas protéicas, representando 177 proteínas diferentes;
- No secretoma de referência de *H. seropedicae* foram identificadas 62 proteínas, representado 41 proteínas diferentes;
- Foi observada uma média de 1,5 proteínas/gene, o que indica extensiva regulação destas proteínas por modificações pós-traducionais;
- *H. seropedicae* provavelmente secreta proteínas pelos mecanismos Sec-dependente, Tat-dependente e não clássico;
- O mutante RAMHN1 possui diferentes isoformas de componentes do flagelo;
- Não foram identificadas proteínas diferencialmente secretadas em uma estirpe SmR1-pDS1 de *H. seropedicae*;
- As estirpes SmR1– 173 e *hrcN*-173, que contêm um plasmídeo expressando a proteína AvrPtoB de *P. syringae*, causaram sintomas tipo lesão molhada, necrose e clorose quando inoculadas em folhas de tomate;
- Análises comparativas do secretoma das estirpes SmR1 – 173 e *hrcN*-173 mostraram que a proteína AvrPtoB provocou mudanças no secretoma destas estirpes;

- A secreção diferencial aumentada de diversos componentes do flagelo pela estirpe *hrcN*-173 sugere que em *H. seropedicae*, existe uma regulação cruzada negativa entre componentes do sistema de secreção tipo III e componentes estruturais do flagelo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOT, A. News briefing: A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, v.402, p.715-720, 1999.
- ABRAMOVITCH, R. B.; KIM,Y-J.; CHEN,S.; DICKMAN,M.B.; MARTIN,G.B. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. **EMBO J.**, 22 (1): 60-69 , 2003.
- ABRAMOVITCH, R. B.; MARTIN, G.B. AvrPtoB: A bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. **FEMS Microbiol. Lett.**, 245: 1-8 , 2005.
- AEBERSOLD, R.; GOODLET, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem. Rev.**, 101, 269-295, 2001.
- AKEDA, Y.; GALAN, J.E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. **Nature**, 437: 911-915, 2005.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. TYPE III SECRETION SYSTEM EFFECTOR PROTEINS: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 42: 385-414 , 2004.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins, and death. **J. Bacteriol.**, 179 (18): 5655-5662 , 1997.
- ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. A mRNA Signal for the Type III Secretion of Yop Proteins by *Yersinia enterocolitica*. **Science**, 278 (5340): 1140-1143 1997.
- ANDERSON. J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Revs.**, 54: 450-472, 1990.
- ANTELMANN, H.; TJALSMA, H.; VOIGT, B.; OHLMEIER, S.; BRON, S.; VAN DIJL, JAN MAARTEN; HECKER, M. A Proteomic View on Genome-Based Signal Peptide Predictions. **Genome Res.**, 11 (9): 1484-1502 , 2001.
- ANTELMANN, H.; TJALSMA,H.; VOIGT, B.; OHLMEIER,S.; BRON,S. A Proteomic View on Genome-Based Signal Peptide Predictions. **Genome Res.**, 11 (9): 1484-1502 , 2001.

- ARORA, S.K.; NEELY,A.N.; BLAIR,B.; LORY,S.; RAMPHAL,R. Role of Motility and Flagellin Glycosylation in the Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Burn Wound Infections. **Infect. Immun.**, 73 (7): 4395-4398 , 2005.
- ARORA, S.K.; WOLFGANG,M.C.; LORY,S.; RAMPHAL,R. Sequence Polymorphism in the Glycosylation Island and Flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, 186 (7): 2115-2122 , 2004.
- ATKINSON, M. M.; BAKER, C.J. Role of the Plasmalemma H⁺-ATPase in *Pseudomonas syringae*-Induced K⁺/H⁺ Exchange in Suspension-Cultured Tobacco Cells. **Plant.Physiol.**, 91 (1): 298-303 , 1989.
- AUSMESS, N.; KOBAYASHI, H.; DEAKIN, W.J.; MARIE, C.; KRISHNAN, H.B.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Characterization of NopP, a type III secreted effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **J. Bacteriol.**, 186 (14): 4774-4780 , 2004.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen.nov, sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 36, 86-93, 1986.
- BAUER, Z.; GOMEZ-GOMEZ,L.; BOLLER,T.; FELIX, G. Sensitivity of different ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* toward the bacterial elicitor flagellin correlates with the presence of receptor-binding sites. **J. Biol. Chem.**, 276 (49): 45669-45676 , 2001.
- BEAVIS, R.C.; FENYO, D. Database searching with mass-spectrometric information. **Trends Biotechnol.**, 18 (1): 22-27 , 2000.
- BENDT, A, K.; BURKOVSKI, A.; SCHAFFER, S.; BOTT, M.; FARWICK, M.; HERMANN, T. Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*. **Proteomics**, 3: 1637-1646, 2003.
- BENDTSEN, J.; KIEMER, L.; FAUSBOLL, A.; BRUNAK, S. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC Microbiology**, 5 (1): 58 , 2005.
- BENZ, I.; SCHMIDT, A. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. **Mol. Microbiol.**, 45 (2): 267-276 , 2002.
- BERKS, B. C. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? **Mol. Microbiol.**, 22 (3): 393-404, 1996.
- BERKS, B. C. SARGENT, F.; PALMER, T. The Tat protein export pathway. **Mol. Microbiol.**, 35 (2): 260-274, 2000.

- BINGLE, W. H.; NOMEILLINI, J.F.; SMIT, J. Secretion of the *Caulobacter crescentus* S-Layer protein: further localization of the c-terminal secretion signal and its use for secretion of recombinant proteins. **J. Bacteriol.**, 182 (11): 3298-3301 , 2000.
- BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Reviews: TIBTECH., v.17, p.121-127, 1999.
- BLAYLOCK, R.; MISSIAKAS, K.E.; SCHNEEWIND, D.M. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion ATPase YscN and Its Regulator, YscL. **J. Bacteriol.**, 188 (10): 3525-3534 , 2006.
- BLOCKER, A.; KOMORIYA, K.; AIZAWA, S-I. Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100 (6): 3027-3030 , 2003.
- BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 4: 343-350 , 2001.
- BOEKHORST, J.; WELS, M.; KLEEREBEZEM, M.; SIEZEN, R.J. The predicted secretome of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sheds light on interactions with its environment. **Microbiology**, 152 (11): 3175-3183 , 2006.
- BOGDANOVE, A. J.; BEER, S.V.; BONAS, U.; BOUCHER, C.A.; COLLMER, A.; COPLIN, D.L.; CORNELIS, G.R.; HUANG,H.C.; HUTCHESON, S.W.; PANOPOULOS, N.J.; VAN GIJSEGEM, F. Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. **Mol. Microbiol.**, 20 (3): 681-683 , 1996.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72, 248-254, 1976.
- BUKAU, B.; HORWICH, A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, 6 : 351-366, 1998
- BUTTNER, K.; BERNHARDS, J.; SCHARF, C.; SCHMIDT, R.; MADER, U.; EYMAN, C.; ANTELMANN, H.; VOLKERS, A.; VOLKERS, U.; HECKER, M. A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. **Electrophoresis**, 22: 2908-2935, 2001.
- CAGNEY, G.; AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Sci.**, 1, 1-15, 2003.

- CAHILL, D.J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.1-22.
- CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Anal. Chim. Acta**, 372, 121-145, 1998.
- CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist**, v.49, p.58-62, 2002.
- CHAVES, D.F.S.; FERRER, P.P.; SOUZA, E.M.; CRUZ, L.M.; MONTEIRO, R.A.; PEDROSA, F.O. A two-dimensional proteome reference map of *Herbaspirillum seropedicae* proteins. **Proteomics**, 7, 3759–3763, 2007.
- CHITLARU, T.; GAT, O.; GOZLAN, Y.; ARIEL, N.; SHAFFERMAN, A. Differential proteomic analysis of the *Bacillus anthracis* secretome: distinct plasmid and chromosome co-dependent cross talk mechanisms modulate extracellular proteolytic activities, **J. Bacteriol.**, 188 (10): 3551-3571 , 2006.
- CHOU, M. M.; KENDALL, D.A. Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. **J. Biol. Chem.**, 265 (5): 2873-2880 , 1990.
- CHRISTIE, P. J. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. **Mol. Microbiol.**, 40, 294-305. 2001.
- CLINE, K.; ETTINGER, W.F.; THEG, S.M. Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two lumenal proteins are transported in the absence of ATP. **J. Biol. Chem.**, 267 (4): 2688-2696 , 1992.
- COOMBES, B. K.; FINLAY, B.B. Insertion of the bacterial type III translocon: not your average needle stick. **Trends Microbiol.**, 13 (3): 92-95 , 2005.
- CORNELIS, G. R.; BOLAND, A.; BOYD, A.P.; GEUIJEN, C.; IRIARTE, M.; NEYT, C.; SORY, M-P.; STAINIER, I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62 (4): 1315-1352 , 1998.
- CRISTÓBAL, L.; GIER, J. W.; NIELSEN, H.; VON HIJNE, G. Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. **EMBO J.**, 18, 2982-2990. 1999.
- DECAD, G.; NIKAIDO, H. Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria XII. Molecular-Sieving Function of Cell Wall. **J. Bacteriol.**, 128, 325-336. 1976.

- DEPELAIRE, P. Type I secretion in gram-negative bacteria (Review). **Biochim. Biophys. Acta**, 1694 [1-3], 149-161. 2004.
- DESVAX, M.; PARHAM, N. J.; HENDERSON, I. R. Type V protein secretion: simplicity gone awry? **Curr. Issues Mol. Biol.**, 6 , 111-124. 2004.
- DOUVILLE, K. SecYEG and SecA Are the Stoichiometric components of preprotein translocase. **J. Biol. Chem.**, 270 , (34): 20106-20111 , 1995.
- DRIESSEN, A. J. M.; MANTING, E. H.; DOES, C. The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. **Nature Structural Biol.**, 8, 492-498. 2001.
- DUNN, M. Proteome Analysis. Disponível em: <<http://www.chemsoc.org/chembytes/ezone/1998/dunn.htm>> Acesso em: 10 fev. 2003.
- ECONOMOU, A.; WICKNER, W. SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. **Cell**, 78 835-843, 1994.
- EICHELBERG, K.; GALAN, J.E. Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-Encoded transcriptional activators InvF and HilA, **Infect. Immun.**, 67 (8): 4099-4105 , 1999.
- ESZTER, N.; RIGBY, W.F.C. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Selectively Binds AU-rich RNA in the NAD-binding Region (Rossmann Fold). **J. Biol. Chem.**, 270 : 2755-2763, 1995.
- EVANS, F. F.; RAFTERY, M.J.; EGAN, S.; KJELLEBERG, S. Profiling the secretome of the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* using amine-specific isobaric tagging (iTRAQ). **J. Proteome Res.**, 6: 967-975 , 2007.
- FEKKES, P.; DRIESSEN, A.J. Protein Targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 63 (1): 161-173 , 1999.
- FELIX, G.; DURAN, J.D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **The Plant Journal**, 18 (3): 265-276 , 1999.
- FILLOUX, A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. **Biochim. Biophys. Acta**, 1694[1-3], 163-179. 2004.

- FINK, A. L., Chaperone-Mediated Protein Folding. **Physiol. Rev.**, 79 (2): 425-449 , 1999.
- FINK, D.; FALKE, D.; WOHLHEBEN, W.; ENGELS, A. Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2): modification of glutamine synthase I by an adenylyltransferase. **Microbiol.**, 145: 2313–2322, 1999.
- FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Revs.**, 61 (2): 136-169 , 1997.
- FROTTIN, F.; MARTINEZ, A.; PEYNOT, P.; MITRA, S.; HOLZ, R.C.; GIGLIONE, C.; MEINNEL, T. The proteomics of N-terminal methionine cleavage. **Mol. Cell Proteomics.**, 12: 2336-2349, 2006.
- FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, 171, 3168-3175, 1989.
- GALAN, J. E.; COLLMER, A. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells, **Science** 284: 1322-1328 , 1999.
- GAUTHIER, A.; NIKHIL A. T.; FINLAY, B.B. Bacterial injection machines. **J. Biol. Chem.**, 278 (28): 25273-25276, 2003.
- GENTSCHEV, I.; DIETRICH, G.; GOEBEL, W. The *Escherichia coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. **Trends Microbiol.**, 1: 39-45 , 2002.
- GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BEECHER, D.J.; GOMINET, M.; LERECLUS, D.; WONG, A.C.L.; SENESI, S. Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.**, 184 (23): 6424-6433 , 2002.
- GHOSH, P. Process of Protein Transport by the Type III secretion system. **Microbiol. Mol. Biol. Revs.**, 68 (4): 771-795 , 2004.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. **Trends Plant Sci.**, 7 (6): 251-256 , 2002.
- GÓNZALES-PEDRAJO, B.; DREYFUS, G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. **Mensaje bioquímico XXVII**, 45-63. 2003.
- GORG, A.; BOGUTH, G.; DREWS, O.; KOPF, A.; LUCK, C.; REIL, G.; WEISS, W. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome

analysis. **A Laboratory Manual**. Technische Universität München, 2003.
(<http://www.weihenstephan.de/blm/deg>).

GOURION, B.; ROSSIGNOL, M.; VORHOLT, J.A. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 103 (35): 13186-13191, 2006.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.66, p.39-63, 2002.

GU, S. Q. The signal recognition particle binds to protein L23 at the peptide exit of the *Escherichia coli* ribosome. **RNA**, 9 (5): 566-573 , 2003.

GU, Y-Q.; MARTIN, G.B. Molecular mechanisms involved in bacterial speck disease resistance of tomato. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, 353: 1455-1461 , 1998.

HARTH, G., CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: Extracellular release and characterization of its enzymatic activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 91, 9342-9346. 1994.

HARTH, G.; MARCUS A. HORWITZ, Export of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. a model for studying export of leaderless proteins by pathogenic mycobacteria. **J. Biol. Chem.**, 274 (7): 4281-4292 , 1999.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R.C.; ALA ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 68 (4): 692-744 , 2004.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.**, 6 (9): 370-378 , 1998.

HERBERT, B.R.; LARRY, J.L.; PACKER, N.H.; GOOLEY, A.A.; PEDERSON, S.K. What place for polyacrilamide in proteomics? **Trends Biotech.**, 19, 2001.

HESKETH, A. R., CHANDRA, G., SHAW, A. D.; ROWLAND, J. J.; KELL, D. B., BIBB, M. J.; CHATER, K. F. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. **Mol. Microbiol.**, 46[4], 917-932. , 2002.

HIROSE, I.; SANO, K.; SHIODA, I.; KUMANO, M.; NAKAMURA, K.; YAMANE, K. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-

- dimensional protein electrophoretic study. **Microbiology**, 146 (1): 65-75 , 2000.
- HOLLAND, B.; SCHMITT, L.; YOUNG, J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. **Mol. Membr. Biol.**, 2005.
- HOMMA, M.; KUTSUKAKE, K.; LINO, T. Structural genes for flagellar hook-associated proteins in *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, 163 (2): 464-471 , 1985.
- HUECK, C. J., Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62 (2): 379-433 , 1998.
- HUNGRIA, M. A., Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **R. Bras. Ci. Solo, Campinas**, 18: 339-364 , 1994.
- HURST, M. R. H.; GLARE, T. R.; Trevor A. J. Cloning *Serratia entomophila* Antifeeding Genes--a Putative Defective Prophage Active against the Grass Grub *Costelytra zealandica*. **J. Bacteriol.**, 186 (15): 5116-5128 , 2004.
- HUTCHESON, S. W.; BRETZ, J.; SUSSAN, T.; JIN, S.; PAK, K. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. **J. Bacteriol.**, 183 (19): 5589-5598 , 2001.
- JAMIR, Y.; GUO, M.; OH, H-S.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; CHEN, S.; TANG, S.; DICKMAN, M.B.; COLLMER, A.; ALFANO, J.R. Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. **Plant J.**, 37 (4): 554-565 , 2004.
- JANJUSEVIC, R.; ABRAMOVITCH, R.B.; MARTIN, G.B.; STEBBINS, E. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an e3 ubiquitin ligase. **Science**, 311: 222-226 , 2006.
- JEFFERY, C. J. Moonlighting proteins. **Trends Biochem. Sci.**, 1999.
- JHA, G.; RAJESHWARI, R.; SONTI, R. V. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. **Mol. Plant Microbe Interact.** 18[9], 891-898. 2005.
- JIN, Q.; THILMONY, R.; ZWIESLER-VOLLICK, J.; HE, S.Y. Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. **Microbes Infect.**, 5: 301-310 , 2003.
- JUNGBLUT, P.R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes Infect.**, 3, 831-840, 2001.

- KARLIN, S.; MRAZEK, J. Predicted highly expressed genes of diverse prokaryotic genomes. **J. Bacteriol.**, 182: 5238-5250, 2000.
- KAZEMI-POUR, N., G. Condemine, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*, **Proteomics**, (4): 3177-3186 , 2004.
- KEEN, N. T. TAMAKI,S.; KOBAYASHI, D.; GERHOLD, D.; STAYTON, M.; SHEN, H.; GOLD, J.; LORANG, H.; THORDAL-CHRISTENSEN, D.; DAHLBECK, D.; STASKAVICZ, B.J. Bacteria expressing avirulence gene D produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 3: 112-121 , 1990.
- KIM, D. W.; CHATER,K.; LEE, K.J.; HESKETH, A.Changes in the Extracellular Proteome Caused by the Absence of the bldA Gene Product, a Developmentally Significant tRNA, Reveal a New Target for the Pleiotropic Regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. **J. Bacteriol.**, 187 (9): 2957-2966, 2005.
- KIM, Y. C.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J. Superoxide Dismutase Activity in *Pseudomonas putida* Affects Utilization of Sugars and Growth on Root Surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, 66: 1460-1467, 2000.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Humangenetik**, v.26, p.231-243, 1975.
- KOMORIYA, K.; SHIBANO, N.; HIGANO, T.; AZUMA, N.; YAMAGUCHI, S.; AIZAWA, S.I. Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. **Mol. Microbiol.**, 34 (4): 767-779 , 1999.
- KONKEL, M.; KLENA, J.D.; RIVERA-AMILL, V.; MONTEVILLE, M.R.; BISWAS, D.; RAPHAEL, B.; MICKELSON, J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. **J. Bacteriol.**, 186 (11): 3296-3303 , 2004.
- KUBORI, T.; MATSUSHIMA,Y.; NAKAMURA, D.; URALIL, J.; LARA-TEJERO, M.; SUKHAN, A.; GALAN, J.E.; AIZAWA, S. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. **Science**, 280: 602-605 , 1998.
- KUNZE, G.; ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NIEHAUS, K.; BOLLER, T.; FELIX, G. The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants, **The Plant Cell**, 16: 3496-3507, 2004.

- LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, 227, 680-685, 1970.
- LAMONICA, J M. Comparative secretome analyses of three *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents. **Infect. Immun.**, 2005.
- LEE, H.M.; WANG,K.C.; LIU,Y.L.; YEW,H.Y.; CHEN,L.Y.; LEU,W.M.; CHEN,D.C.; HU,N.T. Association of the cytoplasmic membrane protein xpsn with the outer membrane protein xpsd in the type ii protein secretion apparatus of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **J. Bacteriol.**, 182 (6): 1549-1557 , 2000.
- LEE, V. T.; SCHNEEWIND, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. **Genes Dev.**, 15 (14): 1725-1752 , 2001.
- LÉTOFFÉ, B. R., GHIGO, J. M., DEPELAIRE, P.; WANDERSMAN, C. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. **Gene**, 192[1], 7-11. 1997.
- LINDGREN, P. B., The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 35: 129-152 , 1997.
- LOGAN, S. M.; TRUST, T.J.; GUERRY, P. Evidence for posttranslational modification and gene duplication of *Campylobacter* flagellin. **J. Bacteriol.**, 171 (6): 3031-3038 , 1989.
- LOGAN, S. M; KELLY, J.F.; THIBAUT, P.; EWING, C.P.; GUERRY, P. Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter* flagellins. **Mol. Microbiol.**, 2: 587-597 , 2002.
- LORY, S. Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 1998.
- MACHADO, H. B., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U., PEDROSA, F.O., Excretion of ammonia by *Azospirillum brasilense*. **Canadian J. Microbiol.** 37: 549-553, 1991.
- MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotech.**, v.21, p.255-261, 2003.
- MARIE, C.; DEAKIN, W,J.; VIPREY, V.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H.B.; PERRET, X.; BROUGHTON, W.J. Characterization of Nops, Nodulation Outer Proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 16 (9): 743-751 , 2003.

- MARIE, C.; DEAKIN, W.J.; OJANEN-REUHS, T.; DIALLO, E.; REUHS, B.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 17 (9): 958-966 , 2004.
- MARTIN, G. B.; BOGDANOVE, A.J.; SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 54: 23-61 , 2003.
- MARUTANI, M.; TAGUCHI, F.; SHIMIZU, R.; INAGAKI, Y.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; CHINOSE, Y. Flagellin from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* induced hrp-independent HR in tomato. **J. Gen. Plant Pathol.**, 71: 289-295 , 2005.
- MATTINEN, L; NISSINEN, R.; RIIPI, T.; NALKKINEN, N.; PIRHONEN, M. Host-extract induced changes in the secretome of the plant pathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. **Proteomics**, 7: 3527-3537 , 2007.
- MATZKE. Evolution in (Brownian) space: a model for the origin of the bacterial flagellum. Disponível em <<http://www.talkdesign.org/faqs/flagellum.html>>.
- MEHTA, A.; ROSATO, Y.B. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by representational difference analysis of cDNA, **Genet. Mol. Biol.**, 28 (1): 140-149 , 2005.
- MINAMINO, T.; MACNAB, R.M. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. **J. Bact.** 181 (5): 1388-1394 , 1999.
- MORI, H.; ITO, K.. The Sec protein-translocation pathway. **Trends Microbiol.**, 9: 494-500, 2001.
- MULLER, M., Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.**, 156: 131-136 , 2004.
- NAGORE, D.; SANZ, B.; SORIA, J.; LLARENA, M.; LLAMA, M.J.; CALVETE, J.J.; SERRA, J.L. The nitrate/nitrite ABC transporter of *Phormidium laminosum*: phosphorylation state of NrtA is not involved in its substrate binding activity. **Biochim. Biophys. Acta**, 1760 (2): 172-181 , 2006.
- NATERA, G.; DJORDJEVIC, M. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Mol. Plant. Microb. Interact.**, 13: 995-1009, 2000.

- NIIMI, M; TANABE, K.; KANEKO,A.; TAKANO,Y.; UMEYAMA, T.; HANAOKA, N; UEHARA,Y.; LAMPING,E.; NIIMI, K.; TSAO, S.; HOLMES,A.R.; MONK,B.C.; CANNON,R.D. Functional analysis of fungal drug efflux transporters by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 58: 1-7 , 2005.
- NIMCHUK, Z.; EULGEM,T.; HOLT,B.F.; DANGL,J.L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Revs of Genetics**, 37: 579-609, 2003.
- NISSINEN, R. M.; YTTERBERG, A.J.; BOGDANOVE, A.J.; VAN WIJK, K.L.; BEER,S.V. Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. **Mol. Plant Pathol.**, 8 (1): 55-67 , 2007.
- O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, 250, 4007-4021, 1975.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems, and leaves, predominantly of gramineae. **Biol. Fertil Soils**, 21, 197-200, 1996.
- OLIVARES, F. L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol.**, 135: 723-737 , 1997.
- OLIVER, S. Guilt-by-association goes global. **Nature**, v.403, p.601-603, 2000.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, 405, 837-846, 2000.
- PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, 23, 95-101, 1984.
- PERRET, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton, Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 64 (1): 180-201 , 2000.
- PETNICKI-OCWIEJA, T.; SCHNEIDER, D.J.; TAM,V.C.; CHANCEY, S.T.; SHAN, L.; JAMIR, Y.; SCHECHTER, L.M.; JANES, M.D.; BUELL, C.R.; TANG, X.; COLLMER, A.; ALFANO, J.R. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 99 (11): 7652-7657 , 2002.

- PRESTON, G. M.;STUDHOLME, D.J.; CALDELARI, I. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. **FEMS Microbiol. Revs.**, 29: 331-360 , 2005.
- PUGSLEY, A. P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. **Microbiol. Rev.**, 57[1], 50-108. 1993.
- PY, B., LOISEAU, L.; BARRAS, F. An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. **EMBO J.**, 2[3], 244-248. 2001.
- RAMOS, A. R. MORELLO, J.E.; RAVINDRAN, S.; DENG, W-L.; HUANG, H-C.; COLLMER, A. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 type iii secretion system hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. **J. Bacteriol.**, 189 (15): 5773-5778 , 2007.
- RATHJEN, J. P.; CHANG, J.H.; STASKAWICZ, B.J.; MICHELMORE, R.W. Constitutively active Pto induces a Prf-dependent hypersensitive response in the absence of avrPto. **EMBO J.**, 18 (3232): 3240 , 1999.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Revs. Plant Sci.**, 19, 227-247, 2000.
- RONCATO-MACARI, L D. B. ; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI,Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiol.**, 45: 39-47 , 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2^{ed}. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SCHAERLAEKENS, K.; VAN MELLAERT, L.; LAMMERTYN, E.; GEUKENS, N.; ANNE, J. The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis. **Microbiol.**, 150 (1): 21-31. 2004.
- SCHAUMBURG, S., DIEKMANN, O., HAGENDORFF, P., BERGMANN, S., ROHDE, M., HAMMERSCHMIDT, S., JEFFERY, C. J., JÄNSCH, L., WEHLAND, J., AND KÄRST, U. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. **Proteomics**, 4, 2991-3006. 2004.
- SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O.N.; PODTELEJNIKOV, A.V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE,

- H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 93, 14440-14445, 1996.
- SILBERG, J. J.; TAPLEY, T.L.; HOFF, K.G.; VICKERY, L.E. Regulation of the HscA ATPase reaction cycle by the co-chaperone HscB and the iron-sulfur cluster assembly protein IscU. **J. Biol. Chem.**: M410117200 , 2004.
- SIMON, R.; PRIEFFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Bio Technology**, 1: 784-791, 1983.
- SOSCIA, C.; HACHANI, A.; BERNADAC, A.; FILLOUX, A.; BLEVES, S. Cross talk between type III Secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, 189 (8): 3124-3132 , 2007.
- STANLEY, N. R., PALMER, T.; BERKS, B.C. The twin arginine consensus motif of tat signal peptides is involved in sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*, **J. Biol. Chem.**, 275 (16): 11591-11596 , 2000.
- SUKHAN, A., KUBORI, T.; GALAN, J.E. Synthesis and localization of the salmonella spi-1 type III secretion needle complex proteins PrgI and PrgJ. **J. Bacteriol.**, 185 (11): 3480-3483 , 2003.
- SUKHAN, A.; KUBORI, T.; GALAN, J.E. Synthesis and localization of the *Salmonella* SPI-1 type III secretion needle complex proteins PrgI and PrgJ, **J. Bacteriol.** 185 (11): 3480-3483 , 2003.
- TAGUCHI, F.; SHIMIZU, R.; NAKAJIMA, R.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; ICHINOSE, Y. Differential effects of flagellins from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *tomato* and *glycinea* on plant defense response. **Plant Physiol. Biochem.**, 41: 165-174 , 2003.
- TAGUCHI, F.; SHIMIZU, R.; INAGAKI, Y.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; ICHINOSE, Y. Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction. **Plant Cell Physiol.**, 44 (3): 342-349 , 2003.
- TAKEUCHI, K.; TAGUCHI, F.; INAGAKI, Y.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; ICHINOSE, Y. Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. **J. Bacteriol.**, 182 (22): 6658-6665 , 2003.
- TAMPAKAKI, A. P.; FADOULOGLOU, V.E.; GAZI, A.D.; PANOPOULOS, N.J.; KOKKINIDIS, M. Conserved features of type III secretion. **Cell. Microbiol.**, 6 (9): 805-816 , 2004.

- TANG, C.; ZHANG, W.; FENYO, D.; CHAIT, B.T. Assessing the performance of different protein identification algorithms. **48th ASMS Conference** , 2000.
- TANG, X.; FREDERICK, R.D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D.A.; JIA, Y.; MARTIN, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto Kinase. **Science**, 274 (5295): 2060-2063 , 1996.
- THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 12[4], 420-430. 2000.
- THANASSI, D. G.; SAULINO, E.T.; HULTGREN, S.J. The chaperone/Usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. **Curr. Opin. Microbiol.**, 1 (2): 223-231 , 1998.
- THIBAUT, P.; LOGAN, S.M.; KELLY, J.F.; BRISSON, J.R.; EWING, C.P.; TRUST, T.J.; GUERRY, P. Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. **J. Biol. Chem.**, 276 (37): 34862-34870 , 2001.
- TJALSMA, H.; ANTELMANN, H.; JONGBLOED, J.D.H.; BRAUN, P.G.; DARMON, E.; DORENBOS, R.; DUBOIS, J.Y.; WESTERS, H.; ZANEN, G.; QUAX, W.J.; KUIPERS, O.P.; BRON, S.; HECKER, M.; VAN DIJL, J.M. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the secrets of the secretome. **Microbiol. Mol. Biol. Revs.**, 68 (2): 207-233 , 2004.
- TJALSMA, H.; BOLHUIS, A.; JONGBLOED, J. D.H.; BRON, S.; VAN DIJL, J. M. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. **Microbiol. Mol. Biol. Revs.**, 64 (3): 515-547 , 2000.
- TOTTEN, P. A.; LORY, S. Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK. **J. Bacteriol.**, 172 (12): 7188-7199 , 1990.
- TSUNEZUKA, H., FUJIWARA, M., KAWASAKI, T.; SHIMAMOTO, K. Proteome Analysis of Programmed Cell Death and Defense Signaling Using the Rice Lesion Mimic Mutant cdr2. **MPMI** 18 :, 52-59, 2005.
- TUCKER, S. C.; GALAN, J.E. Complex function for SicA, a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium type III secretion-associated chaperone. **J. Bacteriol.**, 182 (8): 2262-2268 , 2000.
- VANET, A.; LABIGNE, A. Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some *Helicobacter pylori* proteins. **Infect. Immun.**, 1998.

- VIPREY, V.; DEL GRECO, A.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol. Microbiol.**, 28 (6): 1381-1389 , 1998.
- VITIKAINEN, M.; LAPPALAINEN, I.; SEPPALA, R.; ANTELMANN, H.; BOER, H.; TAIRA, S.; SAVILAHTI, H.; HECKER, M.; VIHINEN, M.; SARVAS, M.; KONTINEN, V.P. Structure-function analysis of prsa reveals roles for the parvulin-like and flanking n- and c-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.**, 279 (18): 19302-19314 , 2004.
- VON HEIJNE, G. The signal peptide. **J. Membr. Biol.**, 115, 195-201. , 1990.
- WALZ, A.; MUJER, C.V.; CONNOLLY, J.P.; ALEFANTIS, T.; CHAFIN, R.; DAKE, C.; WHITTINGTON, J.; KUMAR, S.P.; KHAN, A.S.; DELVECCHIO, V.G. *Bacillus anthracis* secretome time course under host-simulated conditions and identification of immunogenic proteins. **Proteome Sci.**, 5 (11) , 2007.
- WASINGER, V.C.; POLLACK, D.; HUMPHERY-SMITH, I. The proteome of *Mycoplasma genitalium*. **Eur. J. Biochem.**, 267: 1571-1582, 2000.
- WEHMHONER, D.; HAUSSLER, S.; TUMMLER, B.; JANSCH, L.; BREDENBRUCH, F.; WEHLAND, F.; STEINMETZ, I. Inter- and intracolonial diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* proteome manifests within the secretome. **J. Bacteriol.**, 185 (19): 5807-5814 , 2003.
- WEI, Z. M.; SNEATH, J.B.; BEER, S.V. Expression of *Erwinia amylovora* hrp genes in response to environmental stimuli. **J. Bacteriol.**, 174 (6): 1875-1882 , 1992.
- WELCH, R. A.; DELLINGER, P.; MINSHEW, B.; FALKOW, S. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. **Nature**, 294: 665-667 , 1981.
- WENGELNIK, K.; ACKERVEKEN, A.; BONAS, U. HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria is homologous to two-component response regulators. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 9: 704-712 , 1996.
- WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Part III: Course Manual, Step 9: In-gel digestion. In: WESTERMEIER, R; NAVEN, T. (Ed.). **Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VCH, 2004. p.261.
- WIELAND, F.; PAUL, G.; SUMPER, M. Halobacterial flagellins are sulfated glycoproteins. **J. Biol. Chem.**, 260 (28): 15180-15185 , 1985.

WILKINS, M.R.; HOCHSTRASSER, D.F. **Thinking bigproteome studies in a post-genome era.** Disponível em: <<http://www.abrf.org/Proteome.html>> Acesso em 02 set. 2003.

WOESTYN, S.; ALLAOUI, A.; WATTIAU, P.; CORNELIS, G.R. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. **J. Bacteriol.**, 176 (6): 1561-1569 , 1994.

WOODS, D. E.; STRAUS, D.C.; JOHANSON, W.G.,JR.; BERRY,V.K.; BASS, J.A. Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. **Infect. Immun.**, 29 (3): 1146-1151 , 1980.

WYSZYNSKA, A., TOMCZYK, K.; JAGUSZTYN-KRYNICKA, E. Comparison of the localization and post-translational modification of *Campylobacter coli* CjaC and its homolog from *Campylobacter jejuni*, Cj0734c/HisJ. **Acta Biochim. Pol.**, 54 (1): 143-150 , 2007.

XIAO, F., GIAVALISCO, P.; MARTIN, G.B. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrPtoB is phosphorylated in plant cells on serine 258, promoting its virulence activity. **J. Biol. Chem.**, 282 (42): 30737-30744 , 2007.

XIAO, Y.; HEU, S.; YI, J.; LU, Y.; HUTCHESON, S.W. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 hrp and hrmA genes. **J. Bacteriol.**, 176 (4): 1025-1036 , 1994.

XIAO, Y.; LU, Y.; HEU, S.; HUTCHESON, S.W. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp cluster. **J. Bacteriol.**, 174 (6): 1734-1741 , 1992.

YOUNG, G. M.; SCHMIEL, D.H.; MILLER, V.L. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: The flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96 (11): 6456-6461 , 1999.

ZIPFEL, C.; ROBATZEK,S.; NAVARRO,L.; OAKELEY, E.J.; JONES, J.D.G.; FELIX,G.; BOLLER,T. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **Nature**, 428: 764-767 , 2004.

7 ANEXOS

**ANEXO I - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO GEL DE REFERÊNCIA DO
PROTEOMA CITOSÓLICO DE *H. seropedicae***

| ID | pl exp. | MM exp. | pl teor. | MM teor. | Matc hes | Cob. | ORF | PROTEÍNA |
|----|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|----------|--|
| 1 | 5.00 | 69 | 7.71 | 55.6 | 13/18 | 33 | 260.0036 | Chaperona DnaK |
| 2 | 5.69 | 76 | 5.40 | 76.2 | 15/23 | 27 | 228.0122 | Poliribonucleotídeo nucleotidiltransferase |
| 3 | 5.80 | 76 | 5.38 | 77.6 | 17/25 | 33 | 194.0021 | Fator de elongação EF-G1 |
| 4 | 6.11 | 84 | 5.50 | 95.1 | 29/32 | 42 | 269.0310 | Protease Clp dependente de ATP |
| 5 | 5.52 | 61 | 5.29 | 63.9 | 22/29 | 38 | 244.0454 | 30s subunidade ribossomal S1 |
| 6 | 5.88 | 68 | 5.90 | 56.6 | 8/12 | 22 | 267.0068 | Dihidrolipoamida desidrogenase |
| 7 | 6.17 | 73 | 5.59 | 81.2 | 13/16 | 28 | 265.0289 | Catalase (peroxidase I) |
| 8 | 6.40 | 79 | 5.77 | 84.2 | 16/24 | 24 | 241.0312 | Enzima málico oxidorrredutase dependente de NADP |
| 9 | 6.48 | 74 | 5.80 | 79.9 | 17/22 | 30 | 256.0467 | Enzima málico oxidorrredutase dependente de NADP |
| 10 | 6.89 | 81 | 5.96 | 48.3 | 12/14 | 21 | 175.0065 | NADH desidrogenase I (Cadeia G) oxidorrredutase |
| 12 | 6.24 | 64 | 5.62 | 61.0 | 13/22 | 28 | 174.0040 | CTP sintase (UTP-amônia liase) |
| 13 | 6.52 | 63 | 5.87 | 68.2 | 11/16 | 23 | 235.0017 | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase |
| 14 | 5.85 | 59 | 5.48 | 52.2 | 10/14 | 28 | 254.0347 | Glutamina sintetase |
| 15 | 5.97 | 58 | 5.48 | 52.2 | 8/12 | 23 | 254.0347 | Glutamina sintetase |
| 16 | 5.14 | 55 | 5.13 | 56.8 | 28/31 | 61 | 287.0016 | Chaperonina GroEL (família HSP60) |
| 17 | 5.00 | 55 | 5.13 | 56.8 | 25/28 | 55 | 287.0016 | Chaperonina GroEL (família HSP60) |
| 18 | 5.29 | 54 | 5.18 | 49.7 | 17/19 | 36 | 180.0065 | Peptidil-prolil cis/trans isomerase |
| 19 | 5.34 | 50 | 5.17 | 50.3 | 14/16 | 44 | 283.0334 | F0F1 ATP sintase, subunidade beta |
| 20 | 5.51 | 48 | 5.21 | 46.6 | 14/18 | 36 | 284.0657 | Histidinol desidrogenase oxidorrredutase |
| 21 | 5.67 | 50 | 5.30 | 49.4 | 12/18 | 34 | 279.0055 | XAA-PRO aminopeptidase |
| 22 | 5.21 | 51 | 5.17 | 50.3 | 15/21 | 49 | 283.0334 | FoF1 ATP sintase, subunidade beta |
| 23 | 4.79 | 43 | 4.83 | 45.9 | 10/15 | 29 | 174.0063 | Enolase (2-Fosfoglicerato desidratase) |
| 24 | 4.86 | 42 | 4.83 | 45.9 | 19/23 | 48 | 174.0063 | Enolase (2-Fosfoglicerato desidratase) |
| 25 | 5.42 | 42 | 5.15 | 41.1 | 15/19 | 57 | 259.0213 | Succinil-CoA sintetase, cadeia beta |
| 26 | 5.53 | 44 | 5.15 | 41.1 | 10/23 | 57 | 259.0213 | Succinil-CoA sintetase, cadeia beta |

| ID | pl exp. | MM exp | pl teor. | MM teor | Matches | Cob. | ORF | PROTEÍNA |
|----|---------|--------|----------|---------|---------|------|----------|--|
| 26 | 5.53 | 44 | 5.65 | 34.1 | 8/19 | 33 | 208.0203 | Tiorredoxina redutase oxidorreductase |
| 28 | 4.98 | 37 | 4.92 | 39.7 | 8/13 | 27 | 283.0899 | Metiltransferase SAM - dependente |
| 29 | 4.94 | 35 | 4.90 | 38.4 | 11/14 | 36 | 191.0096 | Hipotética conservada |
| 30 | 4.85 | 34 | 5.38 | 39.0 | 10/17 | 33 | 272.0552 | Riboquinase |
| 31 | 5.46 | 38 | 5.68 | 36.3 | 9/12 | 40 | 286.1638 | NADPH quinona oxidorreductase |
| 32 | 5.57 | 39 | 5.68 | 36.3 | 8/9 | 26 | 286.1638 | NADPH quinona oxidorreductase |
| 33 | 5.71 | 37 | 5.35 | 35.7 | 14/17 | 52 | 282.0078 | RNA polimerase (cadeia alfa) |
| 34 | 5.43 | 36 | 5.18 | 36.9 | 11/12 | 34 | 281.0354 | Actina-ATPase envolvida na morfogênese celular |
| 35 | 5.61 | 35 | 5.31 | 34.7 | 10/13 | 34 | 256.0022 | 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase |
| 37 | 4.65 | 19 | 4.65 | 31 | 5/8 | 36 | 178.0127 | FKBP peptidil-prolil cis-trans isomerase |
| 38 | 5.54 | 31 | 5.28 | 31.4 | 12/20 | 51 | 231.0129 | Fator de elongação TS (EF-TS) |
| 39 | 5.88 | 34 | 4.94 | 37.0 | 5/13 | 17 | 282.0194 | Δ -aminolevulínico ácido desidratase |
| 39 | 5.88 | 34 | 5.71 | 39.5 | 6/13 | 18 | 207.0078 | Tartarato desidrogenase |
| 40 | 5.96 | 37 | 5.54 | 38.5 | 12/37 | 38 | 252.0080 | 3-isopropilmalato desidrogenase oxidorreductase |
| 40 | 5.96 | 37 | 5.58 | 37.3 | 11/17 | 35 | 269.0700 | Proteína de flagelo; filamento estrutural |
| 40 | 5.96 | 37 | 5.75 | 38.6 | 8/39 | 22 | 210.0207 | Xantina desidrogenase (subunidade A) |
| 41 | 5.96 | 40 | 5.47 | 43.0 | 15/28 | 42 | 249.0030 | GTPase fator de tradução e elongação TU (EF-Tu) |
| 42 | 5.81 | 44 | 5.39 | 42.1 | 11/15 | 47 | 193.0018 | S-adenosilmetionina sintetase |
| 43 | 5.82 | 47 | 5.55 | 43.7 | 14/21 | 36 | 212.0175 | Dihidrolipoamida succiniltransferase |
| 44 | 5.98 | 47 | 5.52 | 49.5 | 12/13 | 29 | 267.0418 | Argininosuccinato sintase |
| 46 | 6.47 | 48 | 5.78 | 47.6 | 14/19 | 33 | 164.0028 | Seril-tRNA sintetase |
| 47 | 6.52 | 51 | 7.02 | 54.6 | 18/25 | 35 | 279.0104 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase |
| 48 | 6.71 | 54 | 5.94 | 56.0 | 11/18 | 30 | 272.0286 | Fosforribosilaminoimidazolecarboxamida formiltransferase |
| 48 | 6.71 | 54 | 6.10 | 55.5 | 10/18 | 24 | 133.0044 | Fumarato hidratase |
| 49 | 6.93 | 59 | 6.15 | 55.4 | 16/24 | 35 | 132.0033 | Flavoproteína-ubiquinona oxidorreductase |
| 50 | 7.11 | 53 | 6.17 | 55.1 | 18/26 | 36 | 283.0351 | FOF1 - ATP sintase, subunidade alfa |
| 52 | 7.41 | 54 | 6.36 | 53.1 | 23/29 | 44 | 195.0065 | Glutamato sintase (subunidade pequena) oxidorreductase |
| 53 | 7.50 | 51 | 8.50 | 28.9 | 6/23 | 31 | 212.0168 | 2-oxoglutarate desidrogenase, componente E3 |

| ID | pl exp. | MM exp | pl teor. | MM teor | Matc hes | Cob. | ORF | PROTEÍNA |
|----|------------|-----------|-------------|------------|-------------|------|----------|--|
| 54 | 7.72 | 48 | 6.64 | 46.7 | 9/16 | 21 | 251.0484 | Adenilosuccinato sintetase |
| 55 | 7.88 | 51 | 7.10 | 26.1 | 9/16 | 48 | 272.0520 | Biotina carboxilase |
| 56 | 6.40 | 42 | 5.70 | 39.5 | 9/14 | 22 | 207.0078 | Tartarato desidrogenase |
| 57 | 6.17 | 44 | 5.59 | 45.2 | 7/11 | 20 | 268.0053 | Glutamato-1-semialdeido 2,1-aminomutase |
| 58 | 6.26 | 41 | 5.70 | 39.5 | 6/21 | 21 | 207.0078 | Tartarato desidrogenase |
| 59 | 5.57 | 39 | 5.68 | 36.3 | 6/9 | 26 | 286.1638 | NADPH quinona oxidoreductase |
| 60 | 6.33 | 35 | 5.68 | 37.6 | 14/20 | 44 | 263.0269 | Galactose-1-fosfato uridililtransferase |
| 61 | 6.27 | 34 | 5.70 | 35.4 | 10/13 | 22 | 254.0062 | Sulfato adenililtransferase subunidade2 |
| 62 | 6.70 | 37 | 6.02 | 36.6 | 12/23 | 46 | 268.0500 | Ceto-ácido redutaisomerase oxidoreductase |
| 62 | 6.70 | 37 | 5.87 | 38.4 | 12/28 | 33 | 259.0332 | Frutose-1,6-bifosfato aldolase |
| 63 | 6.80 | 38 | 6.06 | 43.6 | 14/21 | 41 | 252.0449 | Acetilornitina aminotransferase |
| 64 | 6.85 | 40 | 7.85 | 33.3 | 7/10 | 25 | 269.0190 | Hipotética conservada |
| 65 | 6.94 | 39 | 8.08 | 38.8 | 8/19 | 22 | 184.0136 | HlyD da família de proteínas de fusão de membrana |
| 65 | 6.94 | 39 | 6.25 | 38.3 | 5/19 | 20 | 262.0189 | UDP-glucose 4-epimerase |
| 66 | 7.00 | 39 | 6.16 | 41.6 | 18/22 | 50 | 270.0440 | Acetil-CoA aciltransferase |
| 67 | 6.94 | 38 | 6.19 | 39 | 13/23 | 31 | 267.0451 | 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintase |
| 68 | 7.24 | 42 | 6.26 | 41.6 | 11/24 | 38 | 237.0304 | ABC-prolina/glicina betaine sistema de transporte , ATPase |
| 68 | 7.24 | 42 | 6.24 | 42.6 | 9/24 | 36 | 263.0258 | UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerase |
| 69 | 7.29 | 41 | 7.83 | 35.8 | 7/11 | 22 | 262.0526 | Aril-álcool desidrogenase |
| 70 | 6.62 | 33 | 9.17 | 34.4 | 6/16 | 31 | 195.0016 | Fosforibosilpirofosfato sintetase |
| 71 | 6.96 | 33 | 6.08 | 37.0 | 8/15 | 28 | 286.1012 | Frutose-1,6-bisfosfatase |
| 72 | 7.02 | 34 | 6.25 | 35.3 | 10/19 | 43 | 285.0028 | Malato desidrogenase |
| 73 | 7.24 | 34 | 7.73 | 38.3 | 9/15 | 36 | 267.0221 | L-asparaginase/ Glu-tRNAGln amidotransferase |
| 74 | 7.31 | 36 | 6.50 | 36.1 | 11/24 | 31 | 287.0401 | Álcool desidrogenase |
| 74 | 7.31 | 36 | 6.32 | 35.2 | 6/26 | 21 | 258.0499 | Lactato desidrogenase |
| 75 | 7.39 | 33 | 6.25 | 35.3 | 11/21 | 43 | 285.0028 | Malato desidrogenase |
| 76 | 7.50 | 34 | 6.50 | 36.1 | 11/24 | 38 | 287.0401 | Álcool desidrogenase |
| 77 | 7.66 | 36 | 6.50 | 36.1 | 9/14 | 36 | 287.0401 | Álcool desidrogenase |

| ID | pl exp. | MM exp | pl teor. | MM teor | Matches | Cob. | ORF | PROTEÍNA |
|-----|---------|--------|----------|---------|---------|------|----------|---|
| 78 | 8.14 | 39 | 7.64 | 40.4 | 10/24 | 43 | 270.0667 | Acetil-CoA acetiltransferase (acetoacetil-CoA tiolase) |
| 79 | 8.60 | 39 | 7.64 | 40.4 | 8/20 | 39 | 270.0667 | Acetil-CoA acetiltransferase (acetoacetil-CoA tiolase) |
| 80 | 5.77 | 31 | 5.23 | 28.9 | 10/24 | 37 | 253.0229 | Proteína determinadora de sítio de septo |
| 81 | 6.14 | 31 | 5.52 | 32.8 | 15/26 | 50 | 259.0340 | Fosforibosilaminoimidazole-succinocarboxamide sintase |
| 82 | 6.24 | 31 | 5.58 | 28.8 | 10/14 | 32 | 167.0103 | Inositol monofosfatase (supressor extragenico) |
| 83 | 6.34 | 30 | 5.71 | 29.7 | 10/22 | 32 | 214.0209 | 2,3,4,5-tetrahidropiridina-2-carboxilato N-succiniltransferase |
| 84 | 6.42 | 33 | 5.80 | 36.2 | 9/15 | 30 | 273.0462 | Açúcar fosfato isomerase |
| 85 | 6.42 | 31 | 5.83 | 31.3 | 12/24 | 47 | 183.0113 | Pantoato-beta-alanina ligase (pantotenato sintetase) |
| 86 | 6.43 | 30 | 5.71 | 29.7 | 8/23 | 30 | 214.0209 | 2,3,4,5-tetrahidropiridina-2-carboxilato N-succiniltransferase |
| 88 | 7.58 | 31 | 7.66 | 30.5 | 7/10 | 29 | 259.0219 | Succinil-CoA sintetase cadeia alfa |
| 90 | 8.50 | 31 | 7.66 | 30.5 | 8/17 | 33 | 259.0219 | Succinil-CoA sintetase cadeia alfa |
| 91 | 5.56 | 30 | 5.18 | 31.8 | 6/6 | 25 | 193.0121 | Acetilglutamato quinase |
| 92 | 5.68 | 30 | 5.69 | 31.1 | 10/17 | 36 | 276.0686 | Proteína universal de estresse |
| 93 | 5.65 | 29 | 5.69 | 31.1 | 8/12 | 33 | 276.0686 | Proteína universal de estresse |
| 94 | 5.96 | 29 | 5.75 | 26.9 | 12/30 | 45 | 212.0224 | Succinato desidrogenase, subunidade Fe-S |
| 95 | 6.34 | 38 | 5.82 | 38.2 | 7/25 | 27 | 252.0434 | ATPase com atividade de chaperona |
| 95 | 6.34 | 38 | 5.71 | 39.5 | 7/25 | 26 | 207.0078 | Tartrato desidrogenase |
| 96 | 5.80 | 69 | 5.90 | 56.6 | 9/23 | 20 | 267.0068 | Diidrolipoamida desidrogenase |
| 97 | 4.74 | 29 | 4.71 | 28.3 | 7/20 | 34 | 284.0695 | Fosforibosilformimino-5-aminoimidazole carboxamida ribonucleotídeo (ProFAR) isomerase |
| 98 | 4.83 | 27 | 4.77 | 22.7 | 11/37 | 59 | 281.0054 | Acil CoA:acetate/3-cetoácido CoA transferase, subunidade beta |
| 99 | 4.97 | 28 | 5.36 | 34.0 | 11/20 | 37 | 237.0293 | Transportador ABC-prolina/glicina betaína |
| 100 | 5.09 | 28 | 4.89 | 21.6 | 12/39 | 36 | 285.1179 | Fator P de elongação e tradução (EF-P) |
| 102 | 4.84 | 25 | 4.87 | 20.3 | 9/17 | 47 | 260.0043 | Proteína de choque térmico 24 (HSP-70 cofator) |
| 103 | 5.13 | 24 | 5.07 | 19.9 | 6/7 | 27 | 251.0171 | Fosfatase inorgânica |
| 105 | 5.86 | 26 | 5.77 | 21.8 | 7/20 | 30 | 284.0817 | Ubiquinol-citocromo C redutase (transmembrana) |
| 106 | 5.64 | 27 | 5.28 | 23.2 | 9/27 | 40 | 263.0437 | Hipotética |
| 107 | 5.93 | 28 | 5.52 | 28.2 | 13/22 | 63 | 260.0115 | Dihidrodipicolinato redutase |

| ID | pl exp. | MM exp | pl teor. | MM teor | Matc hes | Cob. | ORF | PROTEÍNA |
|-----|------------|-----------|-------------|------------|-------------|------|----------|---|
| 108 | 6.16 | 27 | 5.63 | 23.5 | 9/15 | 59 | 277.0234 | Hipotética conservada |
| 109 | 6.13 | 30 | 5.62 | 32.0 | 6/12 | 22 | 254.0258 | Carboxifosfoenolpiruvato fosfonomutase |
| 110 | 5.90 | 26 | 5.50 | 24.1 | 8/26 | 50 | 261.0486 | Proteína-L-isoaspartato O-metiltransferase |
| 111 | 6.52 | 27 | 5.88 | 24.7 | 9/11 | 51 | 259.0441 | Piridoxamina 5`-fosfato oxidase |
| 112 | 6.60 | 27 | 5.99 | 27.7 | 6/7 | 33 | 282.0313 | 2,3-bisfosfoglicerato-dependente fosfoglicerato mutase |
| 113 | 6.72 | 27 | 5.83 | 23.8 | 12/26 | 46 | 282.0109 | Peroxiredoxina |
| 114 | 6.81 | 27 | 6.02 | 24.8 | 12/29 | 58 | 281.0058 | Acil CoA:acetato/3-cetoácido CoA transferase, sub. alfa |
| 117 | 7.75 | 27 | 6.85 | 23.5 | 11/33 | 55 | 256.0172 | Adenilato kinase (ATP-AMP transfosforilase) |
| 118 | 7.62 | 26 | 6.75 | 26.3 | 8/10 | 25 | 285.0252 | Acetoacetyl-CoA redutase |
| 120 | 7.83 | 23 | 6.76 | 19.8 | 8/25 | 65 | 199.0025 | Fasina |
| 125 | 8.90 | 27 | 7.71 | 26.6 | 6/18 | 26 | 138.0029 | Transportador ABC-glutamato/aspartato |
| 126 | 5.88 | 24 | 4.97 | 16.6 | 7/9 | 60 | 142.0005 | Peroxirredoxina |
| 128 | 6.58 | 24 | 5.68 | 36.3 | 7/12 | 37 | 286.1638 | NADPH quinona oxidoreductase |
| 129 | 6.45 | 23 | 5.82 | 21.4 | 5/7 | 33 | 256.0232 | Superóxido dismutase proteína [Fe] |
| 130 | 6.98 | 26 | 6.75 | 26.3 | 9/10 | 22 | 285.0252 | Acetoacetyl-CoA redutase |
| 131 | 7.04 | 26 | 6.90 | 30.0 | 6/6 | 23 | 227.0222 | Proteína de quimiotaxia |
| 137 | 5.67 | 23 | 5.29 | 22.0 | 5/17 | 34 | 180.0068 | Clp protease dependente de ATP |
| 140 | 4.72 | 21 | 4.71 | 17.1 | 9/18 | 62 | 173.0100 | Fator de transcrição e elongação |
| 142 | 5.65 | 19 | 5.20 | 14.9 | 4/12 | 27 | 283.0322 | F0F1- ATP sintase, subunidade epsilon |
| 143 | 5.58 | 19 | 5.12 | 16.9 | 4/13 | 33 | 282.0358 | DnaK supresor |
| 145 | 6.13 | 19 | 5.58 | 17.7 | 5/8 | 49 | 189.0048 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase (rotamase) |
| 146 | 6.53 | 21 | 5.72 | 21.5 | 7/27 | 40 | 285.0243 | Regulador de acumulação de polibetahidroxibutirato (PhbF) |
| 148 | 7.09 | 21 | 5.95 | 19.8 | 9/14 | 52 | 254.0049 | Hipotética conservada |
| 149 | 7.52 | 21 | 6.65 | 20.5 | 7/15 | 50 | 259.0449 | Proteína peptídeo sinal |
| 151 | 7.91 | 20 | 6.61 | 18.4 | 10/21 | 52 | 273.0356 | Proteína de ligação ao DNA por único segmento |
| 153 | 8.00 | 19 | 8.94 | 19.3 | 4/9 | 27 | 231.0036 | Proteína transmembrana |
| 155 | 6.39 | 18 | 5.73 | 17.0 | 7/34 | 40 | 269.0274 | S-adenosilmetionina:2-demetilmenaquinone metiltransferase |
| 157 | 5.42 | 17 | 5.11 | 17.0 | 6/20 | 37 | 252.0143 | Hipotética conservada |

| ID | pl exp. | MM exp | pl teor. | MM teor | Matc hes | Cob. | ORF | PROTEÍNA |
|-----|------------|-----------|-------------|------------|-------------|------|----------|--|
| 158 | 5.52 | 17 | 5.18 | 12.2 | 3/6 | 24 | 258.0510 | FKBP peptidil-prolil cis-trans isomerase |
| 160 | 5.65 | 16 | 6.11 | 23.3 | 6/8 | 23 | 251.0567 | Hipotética conservada |
| 162 | 6.36 | 12 | 5.60 | 14.0 | 7/32 | 36 | 173.0053 | Proteína de Glicolato/propanodiol utilização |
| 163 | 6.39 | 14 | 5.81 | 10.5 | 5/8 | 57 | 287.0013 | Co-chaperonina GroES (HSP10) |
| 164 | 6.52 | 16 | 5.71 | 15.5 | 6/15 | 45 | 212.0038 | Nucleosideo-difosfate kinase |
| 165 | 7.40 | 16 | 6.41 | 15.6 | 6/17 | 36 | 233.0318 | Proteína universal de estresse |
| 166 | 6.51 | 12 | 5.87 | 12.3 | 3/3 | 34 | 208.0126 | Proteína regulatória de nitrogênio tipo pII |
| 168 | 6.84 | 17 | 5.80 | 16 | 3/6 | 22 | 287.1406 | Hipotética conservada |
| 171 | 7.86 | 17 | 6.44 | 16.0 | 7/21 | 45 | 260.0106 | Proteína de regulação percepção Férrica |
| 174 | 8.59 | 17 | 8.70 | 18 | 3/8 | 23 | 177.0107 | Hipotética conservada |
| 176 | 7.24 | 13 | 8.40 | 14 | 4/8 | 31 | 272.0696 | Proteína exportada |
| 178 | 7.00 | 16 | 5.90 | 15 | 3/4 | 26 | 274.0631 | Hipotética |
| 179 | 8.14 | 17 | 6.75 | 18.1 | 6/15 | 31 | 229.0159 | Fosfopanteteína adenililtransferase |
| 180 | 6.61 | 50 | 6.15 | 48.6 | 9/18 | 31 | 283.0930 | UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase |
| 181 | 6.53 | 44 | 6.08 | 46.8 | 10/24 | 24 | 229.0149 | Zinco protease peptídeo sinal |
| 182 | 6.53 | 41 | 6.26 | 42 | 7/9 | 29 | 237.0304 | Transportador ABC |
| 183 | 6.52 | 37 | 5.87 | 38.4 | 10/13 | 27 | 259.0332 | Frutose-1,6-bifosfato aldolase |
| 184 | 7.62 | 29 | 6.60 | 27.6 | 8/32 | 32 | 265.0328 | Beta-hidroxibutirato desidrogenase |
| 189 | 6.96 | 29 | 5.99 | 25.5 | 10/18 | 55 | 210.0122 | PKHD- hidroxilase |
| 190 | 7.86 | 31 | 6.73 | 36.0 | 7/18 | 26 | 189.0113 | Acetil-coenzima A carboxilase carboxil transferase |
| 191 | 7.93 | 31 | 7.66 | 30.5 | 7/18 | 25 | 259.0219 | Succinil-CoA sintetase, cadeia alfa |
| 192 | 7.05 | 25 | 6.03 | 23.2 | 11/39 | 51 | 207.0163 | Hipotética conservada |
| 192 | 7.05 | 25 | 5.99 | 22.9 | 9/39 | 42 | 138.0012 | Ubiquinona biossíntese COQ7 |
| 193 | 7.23 | 25 | 8.30 | 24.0 | 5/5 | 21 | 241.0439 | Hipotética |
| 194 | 5.82 | 41 | 5.47 | 43.0 | 6/13 | 22 | 249.0030 | GTPase fator de tradução e alongação TU (EF-Tu) |
| 195 | 5.31 | 64 | 5.16 | 72 | 12/18 | 23 | 266.0558 | HSP90 chaperona G |
| 196 | 7.52 | 34 | 6.06 | 28.9 | 5/14 | 25 | 267.0568 | Gliceraldeído 3-fosfato/eritrose-4-fosfato desidrogenase |
| 197 | 4.58 | 27 | 4.97 | 31.5 | 3/6 | 21 | 198.0146 | Flavoproteína transferidora de elétrons, subunidade alfa |

| ID | pl exp. | MM exp | pl teor. | MM teor | Matches | Cob. | ORF | PROTEÍNA |
|-----|---------|--------|----------|---------|---------|------|----------|---|
| 198 | 6.13 | 36 | 5.82 | 40.2 | 7/7 | 27 | 252.0065 | Aspartato-semialdeído desidrogenase |
| 199 | 6.55 | 29 | 5.82 | 31.8 | 8/13 | 33 | 165.0031 | Hidrolase ou aciltransferase |
| 200 | 6.45 | 27 | 5.88 | 24.7 | 7/10 | 38 | 259.0441 | Piridoxamina 5`-fosfate oxidase |
| 201 | 6.62 | 53 | 5.94 | 58.3 | 9/9 | 23 | 247.0313 | GMP sintase |
| 202 | 7.51 | 17 | 6.07 | 18.1 | 5/5 | 50 | 272.0105 | Proteína DNA-binding ferritin (Protetora de dano oxidativo) |
| 205 | 6.76 | 31 | 5.93 | 32.4 | 7/11 | 26 | 231.0258 | UTP-glucose-1-fosfato uridililtransferase |
| 206 | 6.76 | 24 | 5.80 | 20.5 | 7/10 | 53 | 238.0317 | TetR- Família de reguladores transcripcionais |
| 207 | 6.28 | 27 | 5.66 | 22.9 | 3/7 | 21 | 272.0119 | Tiamina monofosfato sintase |
| 209 | 4.88 | 30 | 4.83 | 26.2 | 4/7 | 21 | 286.0920 | Hipotética conservada |
| 211 | 6.06 | 26 | 5.41 | 27.2 | 6/7 | 22 | 263.0465 | Imidazoleglicerol-fosfato sintase |
| 212 | 6.00 | 69 | 5.53 | 73.6 | 9/11 | 24 | 283.0075 | Hipotética conservada |
| 213 | 6.89 | 55 | 5.88 | 55.6 | 11/12 | 26 | 208.0143 | NAD+ dependente acetaldeído desidrogenase |
| 214 | 5.88 | 21 | 4.97 | 16.6 | 4/9 | 34 | 142.0005 | Peroxiredoxina |
| 215 | 8.96 | 27 | 7.89 | 27.0 | 13/24 | 54 | 231.0137 | 30S subunidade ribosomal S2 |
| 216 | 9.09 | 29 | 7.93 | 32.8 | 6/9 | 23 | 226.0035 | Hipotética conservada |
| 217 | 5.41 | 51 | 5.19 | 13.2 | 5/6 | 37 | 286.1627 | Hipotética |
| 218 | 10.1 | 24 | 9.45 | 21.3 | 7/29 | 34 | 244.0364 | Proteína peptídeo sinal |
| 219 | 10.5 | 12 | 9.69 | 12.0 | 5/7 | 38 | 249.0020 | 30S subunidade ribosomal S10 |
| 221 | 9.94 | 13 | 9.04 | 13.7 | 5/8 | 37 | 269.0651 | 30S subunidade ribosomal S6 |
| 222 | 9.76 | 16 | 8.92 | 15.8 | 5/5 | 31 | 269.0637 | 50S subunidade ribosomal L9 |
| 223 | 4.75 | 25 | 4.75 | 24.5 | 6/6 | 25 | 248.0306 | Protease/amidase intracelular |
| 224 | 5.52 | 99 | 6.09 | 101 | 6/6 | 27 | 287.0662 | Proteína relacionada a VGR |
| 225 | 5.77 | 88 | 5.70 | 92.3 | 10/17 | 28 | 278.0662 | DNA girase, subunidade B |
| 226 | 6.21 | 35 | 5.66 | 32.9 | 5/11 | 29 | 286.0748 | Hipotética |
| 227 | 6.31 | 37 | 5.82 | 21.4 | 4/7 | 29 | 256.0232 | Superóxido dismutase proteína [Fe] |
| 228 | 7.13 | 26 | 6.35 | 21.7 | 8/9 | 45 | 195.0021 | 50S subunidade ribosomal L25 |
| 229 | 5.21 | 61 | 5.29 | 63.9 | 5/10 | 21 | 244.0454 | 30s subunidade ribosomal S1 |
| 230 | 5.79 | 67 | 5.68 | 36.3 | 6/13 | 27 | 286.1638 | NADPH:quinone oxidoreductase |

| ID | pl exp. | MM exp | pl teor. | MM teor | Matches | Cob. | ORF | PROTEÍNA |
|-----|---------|--------|----------|---------|---------|------|----------|---|
| 231 | 5.74 | 76 | 5.40 | 76.2 | 13/17 | 24 | 228.0122 | Polirribonucleotídeo nucleotidiltransferase |
| 232 | 5.64 | 76 | 5.40 | 76.2 | 17/23 | 28 | 228.0122 | Polirribonucleotídeo nucleotidiltransferase |
| 233 | 5.0 | 17 | 5.1 | 18.7 | 7/11 | 50 | 283.0356 | FOF1 ATP sintase, subunidade delta |
| 234 | 4.9 | 22 | 4.6 | 23.3 | 12/16 | 78 | 278.0289 | Hipotética conservada |
| 235 | 6.5 | 40 | 5.4 | 35.5 | 5/5 | 21 | 227.0245 | Co/Zn/Cd sistema de efluxo |
| 236 | 5.5 | 28 | 5.5 | 26.0 | 7/8 | 31 | 269.0074 | TRNA nucleotidiltransferase (ribonuclease PH) |
| 237 | 6.5 | 27 | 5.9 | 25.6 | 5/5 | 24 | 276.0608 | 2,3-bifosfoglicerato-dependente fosfoglicerato mutase |
| 238 | 5.4 | 37 | 5.5 | 35.7 | 8/9 | 22 | 226.0293 | Homo-serina quinase |
| 239 | 5.9 | 40 | 6.2 | 37.2 | 7/10 | 25 | 268.0022 | N-acetil-gamma-glutamil-fosfato redutase |
| 240 | 9.7 | 19 | 9.4 | 19.0 | 5/5 | 22 | 282.0020 | Proteína ribossomal 50S subunidade L6/L9 |
| 241 | 6.7 | 20 | 7.0 | 17.1 | 5/8 | 25 | 244.0482 | N-acetilglucosaminil transferase |

ID = ID da proteína na figura 6; **pl exp.** = pl calculado do gel 2D; **MM exp** = massa molecular aparente calculada do gel 2D; **pl teor.** = pl calculado a partir da sequência do genoma pelo programa ProteinProspector v3.0; **MM teor** = massa molecular teórica calculada da sequência do genoma pelo programa ProteinProspector v3.0; **Matches** = número de peptídeos obtidos experimentalmente que coincidiram com os peptídeos obtidos da clivagem *in silico* da sequência da proteína; **Cob (%)** = porcentagem de cobertura dos peptídeos experimentais que coincidiram com os teóricos; **ORF** = identidade da ORF no genoma de *H. seropedicae*.

ANEXO II: PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO GEL DE REFERÊNCIA

DO SECRETOMA DE *H. seropedicae*

| ID ^a | PM ^b | Cob. ^c | Score ^d | ORF ^e | PROTEÍNA |
|-----------------|-----------------|-------------------|--------------------|------------------|---|
| 1 | 11/14 | 20 | 7.30e+06 | 227.0043 | Proteína associada ao gancho 1 |
| 2 | 9/9 | 17 | 6.74e+03 | 227.0043 | Proteína associada ao gancho 1 |
| 3 | 9/9 | 17 | 6.74e+03 | 227.0043 | Proteína associada ao gancho 1 |
| 4 | 8/9 | 42 | 2.53e+05 | 269.0717 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 5 | 5/9 | 28 | 3.37e+04 | 269.0717 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 6 | 11/23 | 60 | 1.36e+08 | 269.0717 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 7 | 9/9 | 26 | 1.75e+04 | 287.0016 | Chaperonina GroEL |
| 8 | 10/10 | 26 | 2.12e+02 | 180.0065 | Peptidil-prolil cis/trans isomerase |
| 9 | 6/9 | 27 | 2.00e+04 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 10 | 10/18 | 34 | 1.91e+08 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 11 | 9/13 | 27 | 3.83e+06 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 12 | 8/9 | 27 | 1.96e+05 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 13 | 4/9 | 20 | 3.23e+02 | 269.0700 | Flagelina; filamento estutural |
| 14 | 6/8 | 20 | 6.84e+01 | 249.0030 | Fator de elongação EF-Tu |
| 15 | 10/13 | 48 | 2.82e+08 | 286.1638 | NADPH:quinona oxidoredutase |
| 16 | 9/12 | 37 | 1.03e+07 | 286.1638 | NADPH:quinona oxidoredutase |
| 17 | 11/16 | 50 | 6.87e+08 | 286.1638 | NADPH:quinona oxidoredutase |
| 18 | 8/8 | 33 | 1.50e+05 | 227.0027 | Flagelina, N-terminal |
| 19 | 6/14 | 37 | 3.88e+04 | 269.0717 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 20 | 5/6 | 26 | 1.19e+03 | 167.0031 | Proteína lipase transmembrana |
| 21 | 6/11 | 22 | 8.70e+04 | 265.0054 | Serina hidroximetiltransferase |
| 22 | 15/18 | 40 | 1.28e+10 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |

| ID ^a | PM ^b | Cob. ^c | Score ^d | ORF ^e | PROTEÍNA |
|-----------------|-----------------|-------------------|--------------------|------------------|--|
| 23 | 7/7 | 22 | 9.61e+04 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 24 | 17/19 | 39 | 4.07e+12 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 25 | 15/16 | 35 | 2.76e+09 | 255.0091 | Proteína 2 associada ao gancho do flagelo |
| 26 | 4/7 | 21 | 5.99e+01 | 218.0221 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 27 | 4/7 | 20 | 1.22e+03 | 218.0221 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 28 | 9/9 | 30 | 3.97e+05 | 250.0431 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 29 | 5/9 | 20 | 5.76e+02 | 251.0297 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 30 | 6/9 | 21 | 9.95e+03 | 282.0421 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 31 | 6/8 | 24 | 1.74e+04 | 250.0431 | Transportador ABC de aminoácidos, componente periplasmático |
| 32 | 4/13 | 21 | 2.24e+02 | 287.0725 | Proteína regulatória tipo Ara-C |
| 33 | 8/18 | 37 | 2.79e+03 | 238.0006 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 34 | 8/8 | 32 | 2.27e+05 | 193.0074 | Porina |
| 35 | 5/6 | 21 | 1.64e+02 | 284.1361 | Transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático |
| 36 | 4/7 | 21 | 1.29e+02 | 283.1328 | Amidohidrolase-2 |
| 37 | 3/5 | 21 | 1.04e+03 | 177.0087 | Transportador ABC – componente periplasmático |
| 38 | 7/9 | 39 | 1.21e+06 | 177.0087 | Transportador ABC – componente periplasmático |
| 39 | 8/10 | 50 | 1.49e+06 | 215.0122 | Transportador ABC de íons metálicos |
| 40 | 6/6 | 38 | 2.62e+05 | 284.0598 | Transportador ABC envolvido em resistência a solventes orgânicos |
| 41 | 5/5 | 23 | 5.20e+02 | 283.0231 | Peptídeo sinal de intercâmbio tiol:dissulfídeo |
| 43 | 6/6 | 55 | 9.34e+04 | 142.0005 | Peroxiredoxina |

| ID ^a | PM ^b | Cob. ^c | Score ^d | ORF ^e | PROTEÍNA |
|-----------------|-----------------|-------------------|--------------------|------------------|---|
| 44 | 4/5 | 34 | 7.92e+01 | 256.0232 | Superóxido dismutase |
| 45 | 6/9 | 51 | 1.03e+004 | 279.0505 | Hipotética conservada |
| 46 | 6/11 | 51 | 1.03e+004 | 279.0505 | Hipotética conservada |
| 47 | 3/8 | 35 | 1.11e+03 | 269.0706 | Flagelina |
| 48 | 2/2 | 35 | 4.73e+01 | 269.0706 | Flagelina |
| 49 | 5/5 | 37 | 3.86e+03 | 286.1627 | Hipotética |
| 50 | 4/4 | 33 | 1.04e+03 | 212.0038 | Nucleosídeo difosfato quinase |
| 51 | 7/7 | 37 | 1.77e+05 | 214.0155 | Transportador ABC de aminoácidos |
| 52 | 5/6 | 28 | 2.04e+03 | 287.0064 | Transportador ABC de íons metálicos |
| 53 | 4/10 | 22 | 3.88e+02 | 286.1627 | Hipotética |
| 54 | 7/7 | 26 | 3.73e+02 | 265.0054 | Serina hidroximetiltransferase |
| 55 | 10/11 | 22 | 2.36e+07 | 286.1638 | NADPH:quinona oxidoredutase |
| 56 | 5/6 | 22 | 2.84e+02 | 263.0522 | DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase |
| 57 | 5/7 | 22 | 3.59e+03 | 254.0148 | NADH:flavina oxidoredutase |
| 58 | 5/7 | 24 | 7.85e+01 | 268.0500 | Ceto-ácido redutoisomerase oxidoredutase |
| 59 | 4/4 | 23 | 3.54e+02 | 241.0093 | Transportador ABC de açúcares |
| 60 | 7/7 | 24 | 1.23e+02 | 272.0807 | ATPase do sistema tipo II |
| 61 | 5/8 | 23 | 8.90e+02 | 251.0297 | Transportador ABC periplasmático de aminoácidos |
| 62 | 5/8 | 28 | 6.00e+02 | 284.0598 | Transportador ABC envolvido na resistência a solvente orgânicos |
| 63 | 4/5 | 23 | 3.95e+02 | 271.0244 | Proteína de membrana externa |
| 64 | 3/3 | 31 | 3.22e+03 | 281.0058 | Acil CoA:acetato/3-cetoácido CoA transferase |
| 65 | 8/8 | 44 | 4.65e+04 | 256.0172 | Adenilato quinase |

a) **ID** = ID da proteína na figura 10; b) **PM** = número de peptídeos identificados em relação ao número de peptídeos detectados; c) **Cob** = percentual de cobertura da proteína identificada; d) **Score** = score fornecido pelo programa ProteinProspector v2.0; e) **ORF** = número da ORF no genoma de *H. seropedicae*.

ANEXO III: DADOS DE FRAGMENTAÇÃO DA PROTEÍNA FLIC

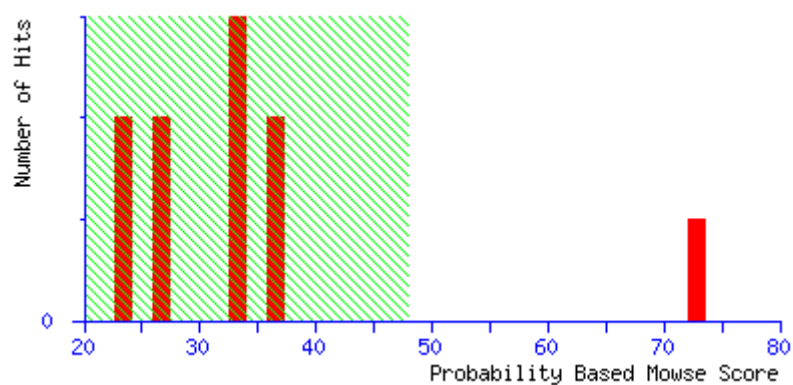
Mascot Search Results

Database : NCBIInr 20080210 (5947209 sequences; 2045123248 residues)
Taxonomy : Bacteria (Eubacteria) (2916498 sequences)
Timestamp : 18 Feb 2008 at 17:26:42 GMT

| | | |
|----------------|------------------------------|--|
| Protein hits : | gi 124483540 | Flagellin protein; filament structural protein [Herbaspirillum seropedicae] |
|----------------|------------------------------|--|

Probability Based Mowse Score

Individual ions scores > 48 indicate identity or extensive homology (p<0.05)



Peptide View

MS/MS Fragmentation of **ASVINTNIPSLNTQR**

Found in [gi|124483540](#), Flagellin protein; [Herbaspirillum seropedicae]

| | b | Seq. | y | # |
|---|----------|------|-----------|----|
| 1 | 72.0444 | A | | 15 |
| 2 | 159.0764 | S | 1556.8391 | 14 |
| 3 | 258.1448 | V | 1469.8071 | 13 |
| 4 | 371.2289 | I | 1370.7387 | 12 |
| 5 | 485.2718 | N | 1257.6546 | 11 |

| | | | | |
|-----------|-----------------|----------|------------------|-----------|
| 6 | 586.3195 | T | 1143.6117 | 10 |
| 7 | 700.3624 | N | 1042.5640 | 9 |
| 8 | 813.4465 | I | 928.5211 | 8 |
| 9 | 910.4993 | P | 815.4370 | 7 |
| 10 | 997.5313 | S | 718.3842 | 6 |
| 11 | 1110.6153 | L | 631.3522 | 5 |
| 12 | 1224.6583 | N | 518.2681 | 4 |
| 13 | 1325.7060 | T | 404.2252 | 3 |
| 14 | 1453.7645 | Q | 303.1775 | 2 |
| 15 | | R | 175.1190 | 1 |